

腎代替療法実施患者の感染モニタリングと
新規の腎移植免疫抑制薬候補化合物に関する研究

草野 淳一

東京薬科大学 博士論文

(2020 年度)

目 次

| | |
|------|----|
| 要旨 | P3 |
| 略語一覧 | P7 |
| 緒言 | P8 |

第一章 健常者、透析患者および慢性腎不全患者の末梢血 T リンパ球中の ATP 量に関する検討

| | |
|--------|-----|
| 第一節 序論 | P14 |
| 第二節 方法 | P14 |
| 第三節 結果 | P16 |
| 第四節 考察 | P21 |
| 第五節 小括 | P22 |

第二章 透析患者および健常者の末梢血単核細胞の T 細胞マイトジェン応答性増殖に対するビタミン K1 および K2 の抑制効果

| | |
|--------|-----|
| 第一節 序論 | P24 |
| 第二節 方法 | P24 |
| 第三節 結果 | P26 |
| 第四節 考察 | P36 |
| 第五節 小括 | P38 |

第三章 植物由来アルカロイドの Tetrandrine およびその類縁体の T リンパ球抑制効果に関する検討

| | |
|--------|-----|
| 第一節 序論 | P39 |
| 第二節 方法 | P39 |
| 第三節 結果 | P41 |
| 第四節 考察 | P55 |
| 第五節 小括 | P57 |

| | |
|------|-----|
| 総括 | P58 |
| 謝辞 | P61 |
| 引用文献 | P62 |

腎代替療法実施患者の感染モニタリングと 新規の腎移植免疫抑制薬候補化合物に関する研究

研究分野 薬物治療学
紹介教授 平野 俊彦
学位申請者 草野 淳一

我が国では、腎代替療法として血液透析、腹膜透析および腎移植が実施されるが、慢性腎臓病(CKD)患者は保存期から透析導入を経過して腎移植に至ることが多い。生命維持のためには継続的な血液透析が必要であるが、長期間にわたる血液透析は患者の QOL に多大な影響を与える。

また、透析患者においては感染症が死亡原因の第 2 位となっており、感染症の発症を予防するための客観的指標が求められている。

一方腎移植においては、急性拒絶反応予防のための免疫抑制療法が必要不可欠である。現在実施されている免疫抑制薬物療法では、その副作用や日和見感染が臨床的大きな問題となっており、新たな免疫抑制薬の開発が期待される。

このように、CKD の腎保存的療法から腎代替療法である透析導入、腎移植に至るまで、患者生命を脅かすリスクは断続的かつ多々存在するのが現状である。

本研究において申請者は、まず第一章で透析患者および各ステージの CKD 患者の感染リスクを把握する目的で、末梢血を用いた ATP 定量を試みた。易感染性の患者を早期に把握できれば、テーラーメイド的に感染症の予防対策を施すことで患者の良好な予後に寄与できるものと考えた。

次に第二章では、腎移植患者に使用し得るビタミン K(VK) 薬の免疫抑制効果を検討した。本邦で保険適用が認められている医薬品の VK1(Phylloquinone) および VK2(Menaquinone) の免疫抑制効果を、健常者および透析患者の末梢血単核細胞(PBMC)を用いて評価し、新たな免疫抑制薬としての VK2 のドラッグリポジショニングの可能性について検討を行った。

さらに第三章においては、生薬成分の Tetrandrine(Tet) および本邦で医薬品として用いられているセファランチン®の有効成分にも該当する Tet 類縁体を対象として、PBMC や各種株化ヒト T 細胞に対する増殖抑制効果を評価し、これらの化合物の新規免疫抑制薬としての可能性を検討した。

第一章 健常者、透析患者および慢性腎不全患者の末梢血 T リンパ球中の ATP 量に関する検討

FDA が認可した IMMUKNOW®を用い、透析患者 17 名および国内の CKD ガイドラインに準拠して G3a、G3b、G4、G5 の 4 群に分けた CKD 患者それぞれ

17 名の末梢 T リンパ球の ATP 値を、健常者 T リンパ球の ATP 値と比較検討した。さらに、各群の血清クレアチニン (S-Cre) 値、年齢、および CKD 群では eGFR 値、透析患者群では透析歴と、末梢 T リンパ球の ATP 値との関連を検討した。また、易感染状態を反映する糖尿病の既往の有無と末梢 T リンパ球の ATP 値との関連についても検討を行った。

全ての患者群における末梢 T リンパ球の ATP 値が、健常者群に比べて低値を示した (表 1)。特に G3a ($p=0.005$)、G3b ($p=0.047$)、G4 群 ($p=0.012$) では有意に低値を示したが、G5 および透析患者群では有意差はなかった。患者の S-Cre 値、年齢、あるいは透析期間と ATP 値との間に有意な相関はなかった。糖尿病性腎症の有無で患者を 2 群に分けた場合、両群間で ATP 値に有意差はなかった。

CKD の保存期においては、早期の Stage より健常者に比べて易感染状態であることが示され、感染症のコントロールが必要であることが分かった。また、末梢血を用いた T リンパ球の ATP 値モニタリングは、透析患者および CKD 患者の感染リスクを把握し、感染症を未然にコントロールするためのテーラーメード医療の一助となり得ることが示された。

表 1 本章で対象とした被験者の性別、年齢および S-Cre 値

| 疾患名 | ステージ | 平均 | 標準偏差 | 中央値 | 最小値 | 最大値 | | | | | |
|------------------|------|-------|-------|-----|-----|-----|-----------------------------------------|---|---|---|---|
| 健常者 (17 例) | | 373.9 | 159.2 | 364 | 127 | 811 |] NS] NS] P=0.012] P=0.047] P=0.005 |] |] |] |] |
| 透析患者 (17 例) | | 313.1 | 149.6 | 275 | 136 | 741 | | | | | |
| CKD 患者 (17 例) | G5 | 298.5 | 139.2 | 267 | 122 | 600 | | | | | |
| CKD 患者 (17 例) | G4 | 238.3 | 116.2 | 219 | 116 | 622 | | | | | |
| CKD 患者 (17 例) | G3b | 259.8 | 101.8 | 252 | 118 | 500 | | | | | |
| CKD 患者 (17 例) | G3a | 225.9 | 93.7 | 227 | 14 | 379 | | | | | |

第二章 透析患者および健常者の末梢血単核細胞の T 細胞マイトジェン応答性増殖に対するビタミン K1 および K2 の抑制効果

VK3 と VK5 の免疫抑制効果は既に報告されているが、これら VK は肝毒性のため臨床応用されていない。そこで申請者は、医薬品として用いられている類縁体の VK1 および VK2 について、健常者と透析患者の PBMC の T 細胞マイトジェン応答性増殖に対する抑制効果を MTT アッセイ法で検討した。また、活性化 PBMC における 7 種の Th1/Th2/Th17 サイトカイン産生量および制御性 T 細胞 (Treg) 発現率への影響を、抗体染色/フローサイトメトリー法により検討した。

VK1 は PBMC の T 細胞マイトジェン応答性増殖を抑制しなかったが、VK2 は濃度依存的に PBMC 増殖を抑制した (図 1)。VK1 は、活性化 PBMC からの 7 種

の Th1/Th2/Th17 サイトカイン産生量に影響を及ぼさなかった。一方 VK2 は、健常者 PBMC からの IL-4 産生量を増加させた ($p=0.04$) が、その他のサイトカイン産生量には影響しなかった。VK1 は Treg 率に影響を与えなかったが、VK2 は 100 mM で健常者 PBMC 中の Treg 率を有意に低下させ ($p=0.04$)、また透析患者 PBMC 中の Treg 率を低濃度から用量依存的に有意に低下させた ($p<0.05$) (図 2)。

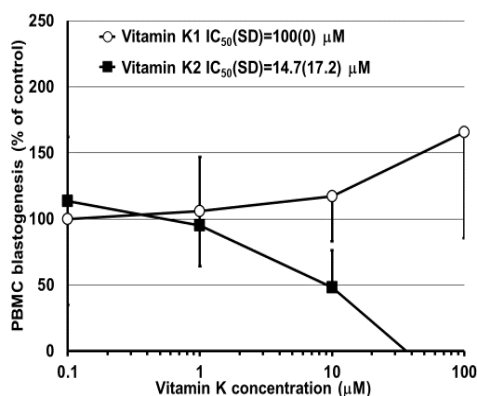


図1 透析患者のPBMCのConA応答性増殖に対するVKの効果

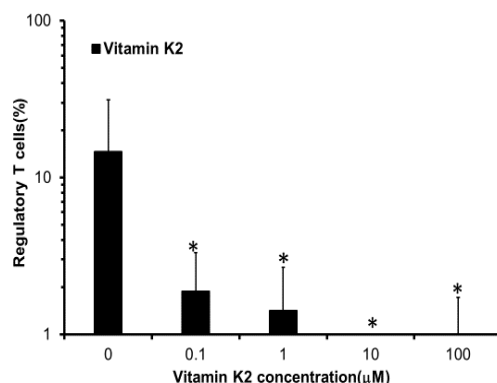


図2 透析患者のPBMC中のCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Treg) 細胞率に及ぼすVK2の影響
* VK2で処理していない細胞 (VK2 0 μM) と比べて、Dunnett検定により $p<0.05$

第三章 植物由来アルカロイドの Tetrandrine およびその類縁体の T リンパ球抑制効果に関する検討

Tetrandrine (Tet) および国内医薬品の有効成分であり Tet の類縁体である Isotetrandrine (Iso-Tet) の、T リンパ芽球性白血病 MOLT-4 細胞およびその薬物耐性株である MOLT-4/DNR 細胞の増殖に対する効果を評価した。同様に、健常者および透析患者 PBMC の T 細胞マイトジェン応答性増殖抑制効果を検討した。また、MOLT-4 細胞および MOLT-4/DNR 細胞の活性化 NF- κ B (p-NF- κ B) 発現に及ぼす効果を、ウェスタンブロット法で解析した。さらに、Tet と Iso-Tet を含む 7 種の類縁体の構造活性相関を検証した。

Tet および Iso-Tet は、MOLT-4 細胞と MOLT-4/DNR 細胞に対して、細胞増殖抑制効果を示した。どちらの細胞に対しても Iso-Tet の方が強い効果を示した。同様に、健常者および透析患者の PBMC の T 細胞マイトジェン応答性増殖に対し、Iso-Tet は Tet より強い抑制効果を示した。また、透析患者の PBMC は健常者の PBMC と比較して、両化合物の細胞増殖抑制効果に対する感受性が低かった。

Tet と Iso-Tet は共に、MOLT-4 および MOLT-4/DNR 細胞の NF- κ B と p-NF- κ B 発現を抑制したが、この効果も Iso-Tet の方が強かった (図 3)。Iso-Tet と Tet の化学構造における絶対配置の違いが、T 細胞増殖抑制効果に違いを与えているものと考えられた。これらの結果より、Iso-Tet は新規免疫抑制薬としてより有望な化合物であることが示唆された。

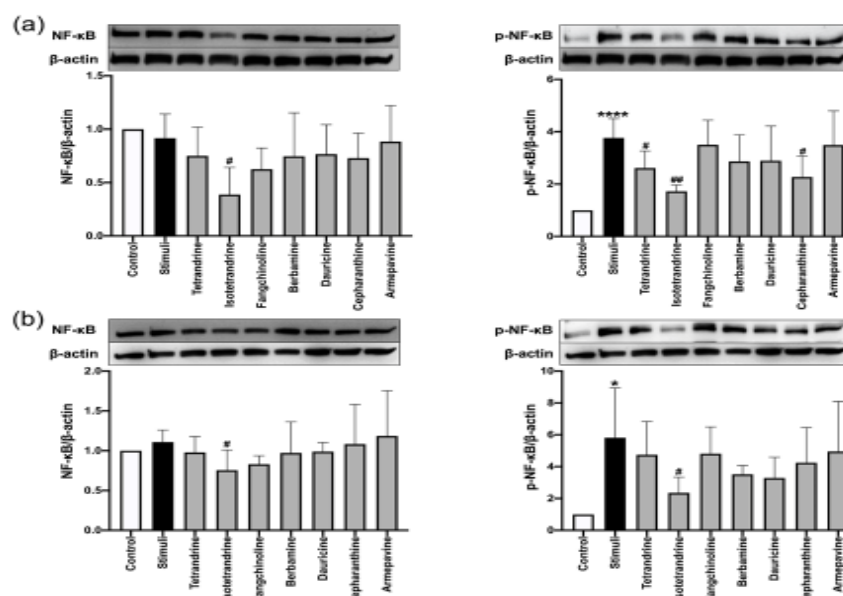


図3 MOLT-4細胞(a)及びMOLT-4/DNR細胞(b)のNF-κB及びリン酸化NF-κB (p-NF-κB)発現に対するTet、Iso-Tet、fangchinoline、berberine、dauricine、cepharanthineおよびarmepavineの効果

7種の類縁体を用いた構造活性相関解析の結果、C12位およびC7位の置換基はT細胞増殖抑制効果に寄与し、特にC12置換基の寄与が大きいことが示された。また、monobenzylisoquinoline構造を持つ化合物と比較しbisbenzylisoquinoline構造を持つ化合物の方がリード化合物として優れていた。一方、2つの酸素原子を含む18員環マクロ環状構造の存在はT細胞増殖抑制効果に寄与し、P糖タンパク質高発現による薬物耐性を回避する過程にも関与していると考えられた。2分子のbenzylisoquinolineユニットの一方のエーテル酸素原子の芳香環上の結合位置の違いは、T細胞増殖抑制効果にさほど寄与しない。以上得られた構造活性相関の知見を活かしてアナログを合成することにより、より有望な新規免疫抑制薬候補化合物を提案できるものと思われた。

【総括】透析患者およびCKD患者の末梢Tリンパ球中のATP値がこれらの患者における易感染性のバイオマーカーとなり得ること、および本情報に基づいてテーラーメイド療法を実施すれば同患者における感染症での死亡率を低減できる可能性を示した。VK2およびTetの類縁体は、腎移植時に用いられる既存の免疫抑制薬の代替えもしくは併用薬として有望であり、今後更なる検討を重ねることにより臨床への応用が期待できるものと結論した。

【研究結果の掲載誌】(1) Ther Apher Dial. 2017: 21: 270-278. (2) J Clin Pharm Ther. 2018: 43: 895-902. (3) Z Naturforsch C. 2020: 76: 21-25. (4) Med Chem Res. 2020: 29: 2123-2129.

略語一覧

ATP : adenosine triphosphate アデノシン三リン酸
CD: cluster of differentiation 分化抗原クラスター
CKD : chronic kidney disease 慢性腎臓病
Con A: concanavalin A
eGFR : estimated glomerular filtration rate 推算糸球体濾過値
FBS: fetal bovine serum
FDA : Food and Drug Administration アメリカ食品医薬品局
GIO : glucocorticoid-induced osteoporosis ステロイド性骨粗鬆症
IL-6 : interleukin-6
IL-10 : interleukin-10
Iso-Tet : isotetrandrine イソテトランドリン
MTT : 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, yellow tetrazole
PBMC : peripheral-blood mononuclear cell 末梢血単核細胞
PHA : phytohemagglutinin
PMA: phorbol-12-myristate-13-acetate
QOL : quality of life クオリティ・オブ・ライフ
S-Cre : serum creatinine 血清クレアチニン
SD : standard deviation 標準偏差
Tet : tetrandrine テトランドリン
TNF- α : tumor necrosis factor 腫瘍壊死因子
Treg : regulatory T cell 制御性 T 細胞
VK : vitamin K ビタミン K

緒 言

透析療法は、慢性腎臓病(CKD)患者が腎の保存的治療では管理不可能と判断された場合に導入される、腎代替療法の一つである。腎代替療法として我が国では、血液透析、腹膜透析および腎移植が実施されている。

本邦において、血液透析患者数は年々増加傾向にあり、2018 年における日本透析医学会の報告によると 30 万人を超えるものと推定された。

血液透析は、末期腎不全患者の生命を維持するための必要不可欠な腎代替療法としては最も広く普及しているが、週 3 回、1 回約 3-5 時間の加療が必要であるため、患者の QOL を著しく低下させる。さらに、血液透析患者の主な死因として心不全(23.5%)、感染症(21.3%)、あるいは悪性腫瘍(8.4%)等が報告されている¹⁾。感染症をコントロールできれば、より多くの患者の生存率と予後を改善することが期待できる。

米国では、患者の免疫能を客観的に評価するために IMMUKNOW[®]が一般的に使用され、米国食品医薬品局(FDA)より認可を受けている。この製品はキットとして販売されており、少量の末梢血を用いて T リンパ球中の ATP を定量することにより腎移植患者における拒絶反応や感染症のリスクを客観的に評価することが可能である。このような背景から、日本でも IMMUKNOW[®]が販売され、これまでに心臓、肺、肝臓、腎臓の各臓器移植患者における感染症や拒絶反応発症のリスクを相対的にモニタリングするために有用である、との報告がなされている²⁻⁶⁾。

もう一方の腎代替療法である腎移植は根治的治療法であるため、患者はその QOL に影響を及ぼす定期的な継続通院の必要がなくなるが、腎移植を実施できる患者には病状や年齢等の制約がある。また移植後の急性拒絶反応発症を予防するために免疫抑制薬物療法が必須となる。

腎移植における免疫抑制療法では、Basiliximab、カルシニューリン阻害薬、代謝拮抗薬および副腎皮質ステロイド薬を組み合わせた薬物療法が中心となる。

カルシニューリン阻害薬は、血中濃度モニタリングによって投与量を調節する。しかしながら、血中濃度が治療域であっても拒絶反応が発生する症例も少なからず見られる。また、過剰免疫抑制からなるサイトメガロウイルス感染症等の日和見感染症やその他の重篤な副作用が、臨床上の大きな課題となっている。このように臓器移植患者においては、拒絶反応の予防目的で実施される免疫抑制薬物療法によって、日和見感染症やステロイド性骨粗鬆症(GIO)等の重篤な副作用を発症する頻度が高い。これらを未然に防ぐためには、薬物血中濃度モニタリングによる投与量の調節以外にも、個々の患者において感染症や拒絶反応発症のリスクを明確にする必要がある。そのため、これら既存の免疫抑制薬の問題点

を軽減しうる新規の免疫抑制薬物療法が望まれる。

新規免疫抑制薬の開発に応用できうる研究手法として、平野らは、*in vitro* において T 細胞マイトジェンで刺激した患者末梢血単核細胞 (PBMC) の増殖に対する既存の免疫抑制薬の薬効が、当該患者における薬物の治療効果と一致することを明らかにした⁷⁾。さらに杉山らは、MTT 法を改良し、個々の患者における免疫抑制薬の薬効をラジオアイソトープを使用せず簡便に知る手段としてこれを広く臨床応用した⁸⁻¹²⁾。これらの報告を踏まえ、申請者はこのような薬効評価法が既存の免疫抑制薬の薬効評価にとどまらず、新規免疫抑制薬の探索のためにも利用できるを考え、本邦で認可を受けている医薬品およびその類縁体のドラッグリポジショニングに着目した。

脂溶性ビタミンの一種であるビタミン K (VK) 類には、VK1、VK2、VK3 (図 1) あるいは VK5 などが知られている。畑中らは、健常者の PBMC を用いた薬物感受性試験において MTT 法を使用し、VK3 と VK5 の免疫抑制効果について考察した¹³⁾。その結果、VK3 と VK5 が、T 細胞マイトジェンで刺激した PBMC の増殖を *in vitro* で強く抑制すること、および活性化 PBMC からの複数のサイトカイン産生も強く阻害することを報告した¹³⁾。しかしながらこれらの VK は、どちらも肝障害のリスクがあるため臨床応用が認められていない。一方、本邦では VK1 (Phylloquinone) が低プロトロンビン血症に、また VK2 (Menaquinone) が骨粗鬆症の治療薬としてそれぞれ保険収載されている。GIO は、副腎皮質ステロイドを用いた免疫抑制療法における重要な副作用の一つである。GIO の治療ガイドラインでは、ビスホスホネート製剤を中心とした骨代謝治療薬が第一選択とされている¹⁴⁾。骨粗鬆症に適応をもつ VK2 に免疫抑制作用が認められれば、副腎皮質ステロイド薬との併用により同薬の減量が期待でき、ステロイドが誘発する骨粗鬆症以外の有害事象に対してもリスクを軽減できる可能性がある。

Tetrandrine (Tet) (図 2) はシマハスノハカズラより抽出されたアルカロイドで、カルシウムチャネル阻害作用を持ち、中国ではリウマチ性関節炎や高血圧に対する血圧降下作用等を目的として使用されている¹⁵⁾。また近年、Tet は *in vitro* において抗腫瘍細胞活性を発現することも報告されている¹⁶⁻¹⁸⁾。Xu らは、血液透析患者の末梢血を用いて MTT 法による薬物感受性試験を行ったところ、Tet が Methylprednisolone の PBMC 増殖抑制効果を相乗的に増強することを見出した¹⁹⁾。Tet は本邦では医薬品として用いられていないが、その類縁体から成るセファランチン®が、放射線による白血球減少症および円形脱毛症・粧糠性脱毛症に対して適応を持つ。セファランチン®はタマサキツヅラフジ抽出アルカロイド製剤であり、主として Cepharanthine、Isotetrandrine、Cycleanine、および Berbamine の 4 成分から構成されている。これまで免疫抑制作用が知られていない医薬品の中から、優れた新規免疫抑制薬のリード化合物となり得る類縁体

を見出すことができれば、腎移植におけるその臨床応用の可能性は広がる。また、類縁体の構造活性相関を検証することにより、より優れたアナログの合成に必要な知見を得ることができる。

以上述べてきたように、血液透析および腎移植という 2 種の腎代替療法には、依然患者予後に重大な影響を及ぼす一連のリスクが存在し得るという現状を鑑み、それらを改善することで **CKD** の早期段階から腎移植までの治療法に新たな見解を得ることは、患者の予後に大きく貢献するものと考えた。

日本腎移植学会の定める生体腎移植のレシピエントの適応基準は、「透析を続けなければ生命維持が困難であるか、または近い将来に透析に導入する必要に迫られている保存期慢性腎不全である」とされている。生体腎移植において、透析療法を受けずに移植を受けるプレエンプティブの腎移植が近年増加しているものの、その比率は生体腎移植の 20 %前後となっている²⁰⁾。また **Kohei** らは、腎移植前の透析期間が移植後の生命予後に有意な影響を及ぼすことはないが、合併症が少ない症例では透析期間によらず予後成績は良好であると報告している²¹⁾。そこで、申請者は本研究において血液透析患者を今後腎移植の対象となる患者と定め、研究の対象とした。

申請者はまず本論文の第一章において、透析患者および各ステージの慢性腎不全患者の末梢血 T リンパ球の **ATP** 定量の有用性と、これらの患者の感染症発症リスクについて検討を行った。

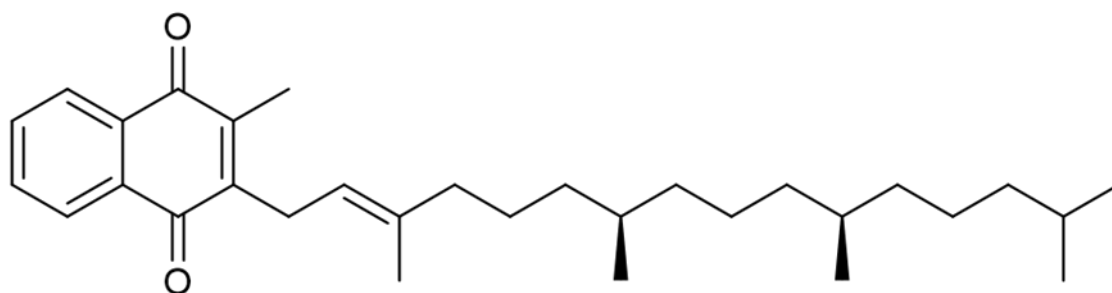
次に第二章において、健常者および透析患者の **PBMC** を用い、T 細胞マイトジェンで活性化した **PBMC** の *in vitro* 増殖に対する **VK1** および **VK2** の薬効を、**MTT** 法により評価した。また、**VK** の免疫抑制作用機序を検討するため、活性化 **PBMC** からの **Th1/Th2/Th17** サイトカイン産生、および活性化 **PBMC** 中の制御性 T 細胞 (**Treg**) 率に及ぼす影響を、フローサイトメトリーにより検討した。

最後に第三章において、**Tet** と **Iso-Tet** が、健常者および透析患者由来の活性化 **PBMC** の増殖に及ぼす効果並びに T リンパ芽球性白血病 **MOLT-4** 細胞とそのダウノルビシン耐性 **MOLT-4/DNR** 細胞の増殖に及ぼす効果と作用メカニズムについて、**NF-κB** に着目して検討した。次いで、T 細胞の異常な活性化を抑えるより有用なリード化合物を探索するために、**Tet** を含めた 7 種の類縁体を用いて構造活性相関を検証した。

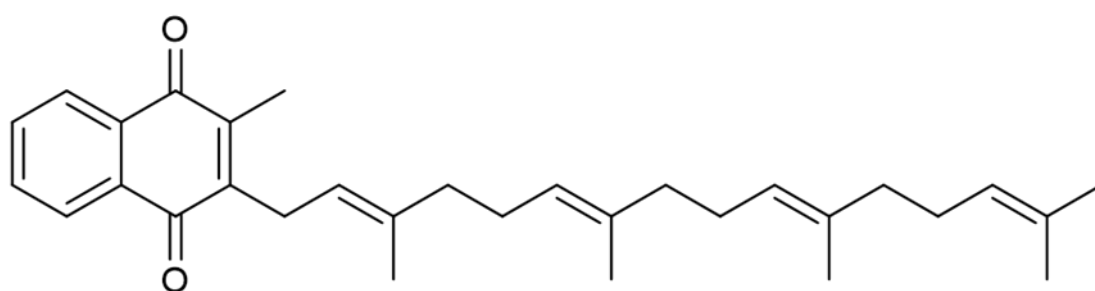
感染症リスクを定量的にモニタリングすることは、透析患者および腎保存的治療を行っている **CKD** 患者のテーラーメイド療法の一助となり得る。また、医薬品の中からドラッグリポジショニングにより新規の免疫抑制薬を見い出せば治療選択肢が広がり、さらにはそれらを既存の免疫抑制薬と併用することで、免疫抑制薬の副作用のリスクを軽減し日和見感染の発症を回避できる可能性がある。

このように本研究で目指した患者免疫能の新たな検査法や新規免疫抑制薬開発の成果は、腎移植療法までを見据えた **CKD** 患者の治療や予後の改善に貢献できるものと考えられる。

Vitamin K1
(phylloquinone)



Vitamin K2
(menaquinone)



Vitamin K3
(menadione)

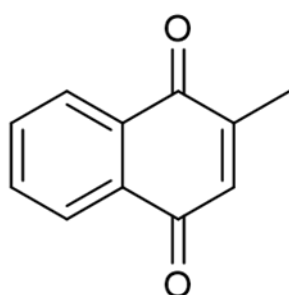


図 1 ビタミン K1、K2、K3 の構造式

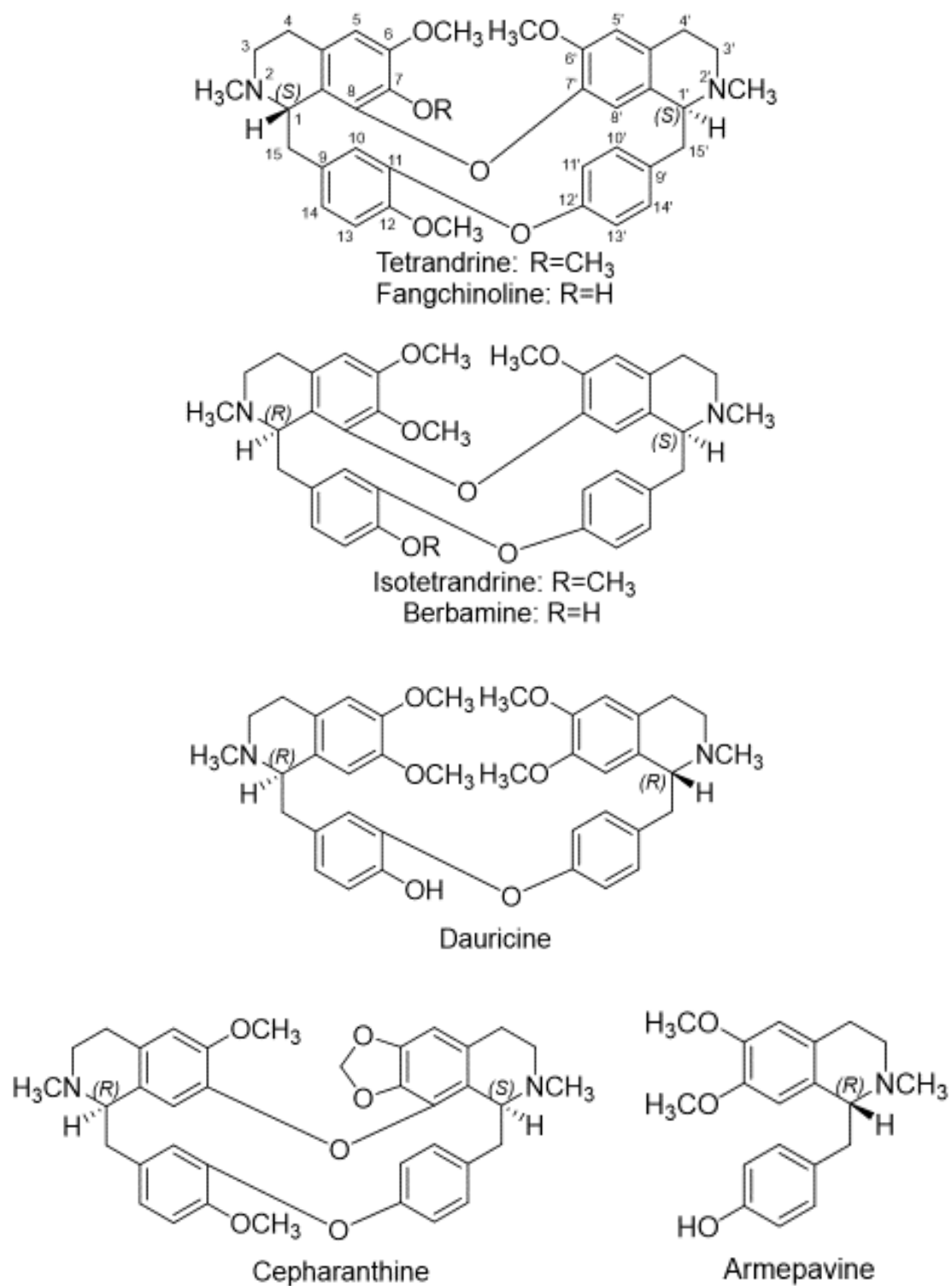


図 2 Tetrandrine (Tet) および類縁体の構造式

第一章 健常者、透析患者および慢性腎不全患者の末梢血 T リンパ球中の ATP 量に関する検討

第一節 序論

申請者は、透析患者および各 CKD 患者の免疫能を疾患のステージ毎に定量的にモニタリングすることにより、透析患者の死因の第 2 位である感染症の予防と腎移植後の免疫抑制薬物療法による日和見感染の発症予測に寄与できると考えた。

そこで本章では、透析患者および各ステージの CKD 患者の末梢血 T リンパ球中の ATP 量を、IMMUKNOW®キットにより定量した。さらに、透析患者と各 CKD 患者における末梢血 T リンパ球の ATP 値と、血清クレアチニン(S-Cre)値、年齢、および透析歴との関連について検討を行った。また、糖尿病患者は易感染性であることから、透析患者および各ステージの CKD 患者における糖尿病の既往の有無と末梢血 T リンパ球中の ATP 値との関連を検討した^{22,23)}。

第二節 方法

1. 試薬

IMMUKNOW®キットを Cylex 社より購入し、実験に用いた。その他の試薬器具は、全て特級品を用いた。

2. 臨床研究としての承認

本研究は、ヘルシンキ宣言に則って行った。また本研究は、「東京薬科大学ヒト組織等を研究活用するための倫理委員会」の承認(12-13)、および平成 24 年 11 月 28 日に一般財団法人神奈川県警友会けいゆう病院(けいゆう病院)の倫理審査委員会の承認を受けて開始した。

けいゆう病院の腎臓内科に通院中もしくは入院中の患者を被験者とし、全被験者より文書にてインフォームドコンセントを実施・同意取得後に、血液検体を入手して東京薬科大学に搬送し、ATP 定量実験を行った。

3. 被験者

健常者、けいゆう病院腎臓内科に入院中の透析患者、および同科に通院中の CKD 患者を対象とした。本研究以前および研究期間中に免疫抑制薬(副腎皮質ステロイド、Ciclosporin、Tacrolimus、Azathioprine、Mycophenolate、Mizoribine)の服用または服用経験がある者は、被験者から除外した。

CKD 患者は CKD 診療ガイド 2012 に従って、推算糸球体濾過値 (eGFR : mL/min/1.73m²) の値により eGFR 60-45 mL/min/1.73m² を G3a 群、45-30 mL/min/1.73m² を G3b 群、30-15 mL/min/1.73m² を G4 群、15 mL/min/1.73m² 以下および透析導入前を G5 群とし、4 群に分けた。健常者、透析患者群、および各ステージの CKD 患者群の被験者数は、それぞれ 17 名とした(表 1)。

表 1 本章で対象とした被験者の性別、年齢および S-Cre 値

| 疾患名 | ステージ | 男/女 | 平均S-Cre値 (mg/dL) (SD) | 平均年齢(歳) (SD) |
|-----------------|------|------|--------------------------|-----------------|
| 健常者 (17 例) | | 15/2 | | 50.7 (8.1) |
| 透析患者 (17 例) | | 16/1 | 10.0 (3.6) | 71.4* (9.9) |
| CKD患者 (17 例) | G5 | 10/7 | 6.2 (2.4) | 67.9* (14.1) |
| CKD患者 (17 例) | G4 | 13/4 | 2.3 (0.5) | 73.9* (12.1) |
| CKD患者 (17 例) | G3b | 14/3 | 1.6 (0.2) | 68.7* (14.5) |
| CKD患者 (17 例) | G3a | 13/4 | 1.1 (0.2) | 60.2 (13.0) |

健常者と透析患者あるいは CKD 患者間で、性別の偏りはなかった (χ^2 検定)。健常者の年齢と患者年齢との間には、G3a 群を除き有意差が見られた (Dunnett test; *p<0.01)。

4. 末梢 CD4 陽性細胞中の ATP 量の測定

静脈血を採取し、ヘパリンで抗凝固処理を行った。血液検体は、常温下でけいゆう病院から東京薬科大学へ搬送後、ATP 定量実験に供した。試薬、マイクロプレートなどは、全てキットに梱包されているものを使用した。はじめに、キット内に添付された 96 穴プレートの各ウェルに T 細胞マイトジェンとして phytohemagglutinin (PHA) 試薬を 10 μ L 添加し、そこへ血液 250 μ L を加えた後、さらに sample diluent を 750 μ L 添加して希釈した。これを振盪混和し、15-18 時間 37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ の条件下にて培養した。マグネチックビーズをコーティングした抗 CD4 モノクローナル抗体を添加し、CD4 陽性細胞を回収した。界面活

性剤を加えて細胞を溶解させ、細胞内の ATP 量をルミノメーターによって定量した(図 3)。

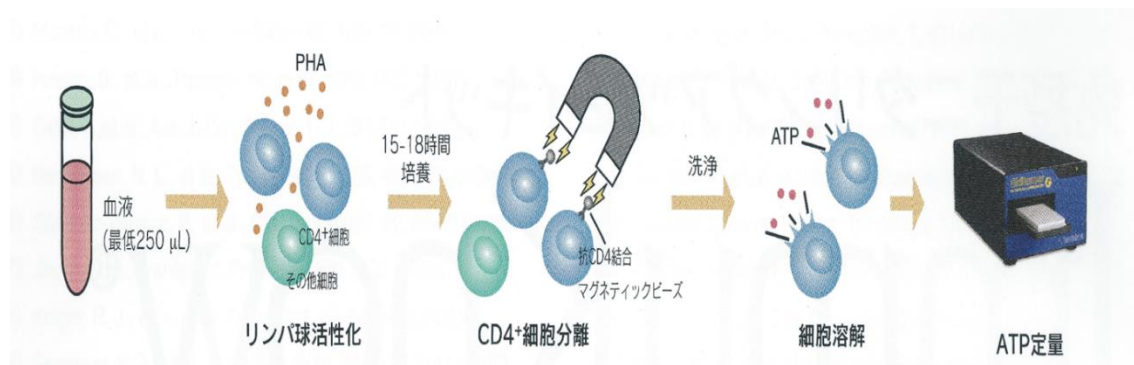


図 3 末梢血中の CD4 陽性細胞の ATP 量測定法

5. 統計解析

末梢血中の CD4 陽性細胞の ATP 値と、被験者の S-Cre 値、年齢、および eGFR 値との相関性は、Pearson 検定、Kendall 検定および Spearman 検定を用いて解析した。透析患者および各ステージの CKD 患者をそれぞれ糖尿病性腎症の有無によって 2 群に分けた場合の、両群間の末梢 CD4 陽性細胞中 ATP 値の違いは、Mann Whitney U 検定を用いて検討した。いずれの場合も、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

第三節 結 果

1. 健常者と患者間における末梢 CD4 陽性細胞中の ATP 値の比較

透析患者および各ステージの CKD 患者の末梢 CD4 陽性細胞における ATP 値は、健常者のそれに比べて低値を示した。特に、健常者と比べて G3a 群、G3b 群、および G4 群の ATP 値は、Dunnett 検定により有意差を認めた(各々 $p = 0.012$ 、 0.047 、および 0.005)。一方、透析患者および末期腎不全にあたる G5 患者の ATP 値も健常者のそれと比較して低値を示したが、この差は有意ではなかった(表 2)。

表 2 健常者と透析患者および CKD 患者の末梢 CD4 陽性細胞における ATP 値 (ng/mL) の比較

| 疾患名 | ステージ | 平均 | 標準偏差 | 中央値 | 最小値 | 最大値 | | | | | |
|------------------|------|-------|-------|-----|-----|-----|-----------------------------------------|---|---|---|---|
| 健常者 (17 例) | | 373.9 | 159.2 | 364 | 127 | 811 |] NS] NS] P=0.012] P=0.047] P=0.005 |] |] |] |] |
| 透析患者 (17 例) | | 313.1 | 149.6 | 275 | 136 | 741 | | | | | |
| CKD 患者 (17 例) | G5 | 298.5 | 139.2 | 267 | 122 | 600 | | | | | |
| CKD 患者 (17 例) | G4 | 238.3 | 116.2 | 219 | 116 | 622 | | | | | |
| CKD 患者 (17 例) | G3b | 259.8 | 101.8 | 252 | 118 | 500 | | | | | |
| CKD 患者 (17 例) | G3a | 225.9 | 93.7 | 227 | 14 | 379 | | | | | |

2. 患者特性と末梢 CD4 陽性細胞中の ATP 値との関連

透析患者における ATP 値と S-Cre 値、年齢、あるいは透析期間との間には、有意な相関は見られなかった (各々 Pearson、Kendall、および Spearman 検定による) (図 4-6)。

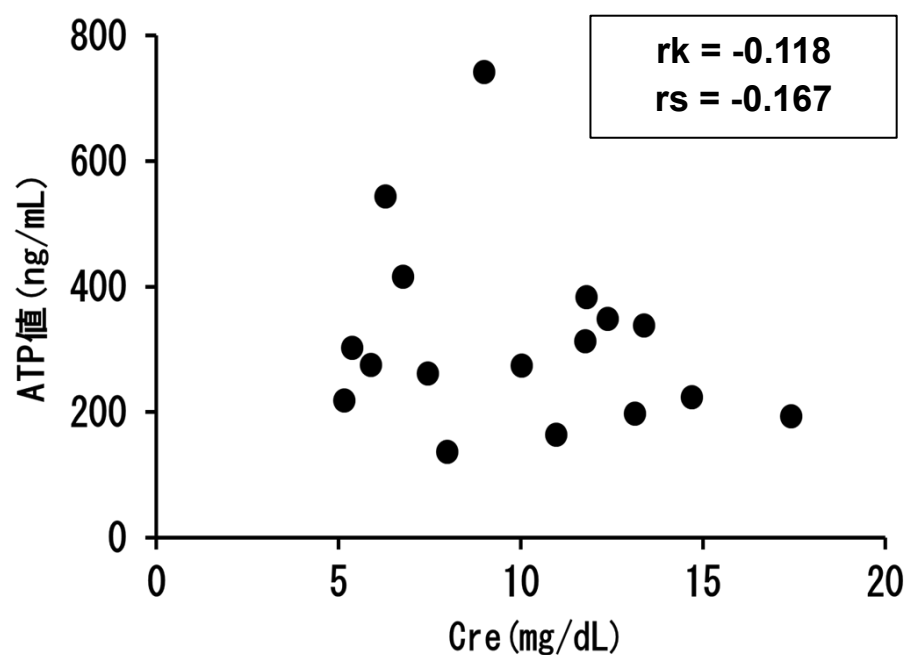


図 4 透析患者における末梢 CD4 陽性細胞の ATP 値と S-Cre 値との関係

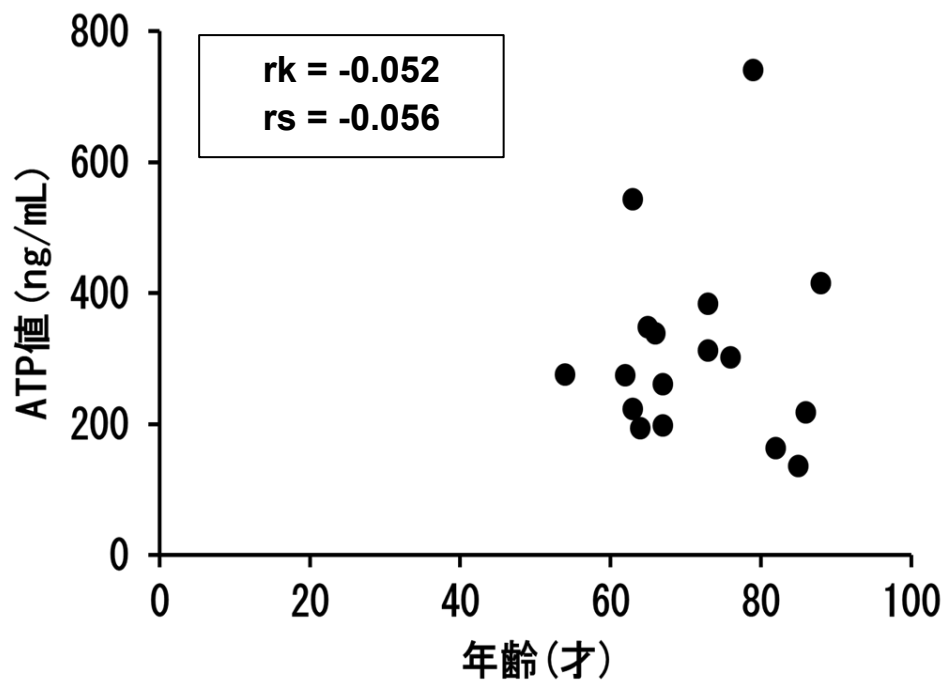


図 5 透析患者における末梢 CD4 陽性細胞の ATP 値と年齢との関係

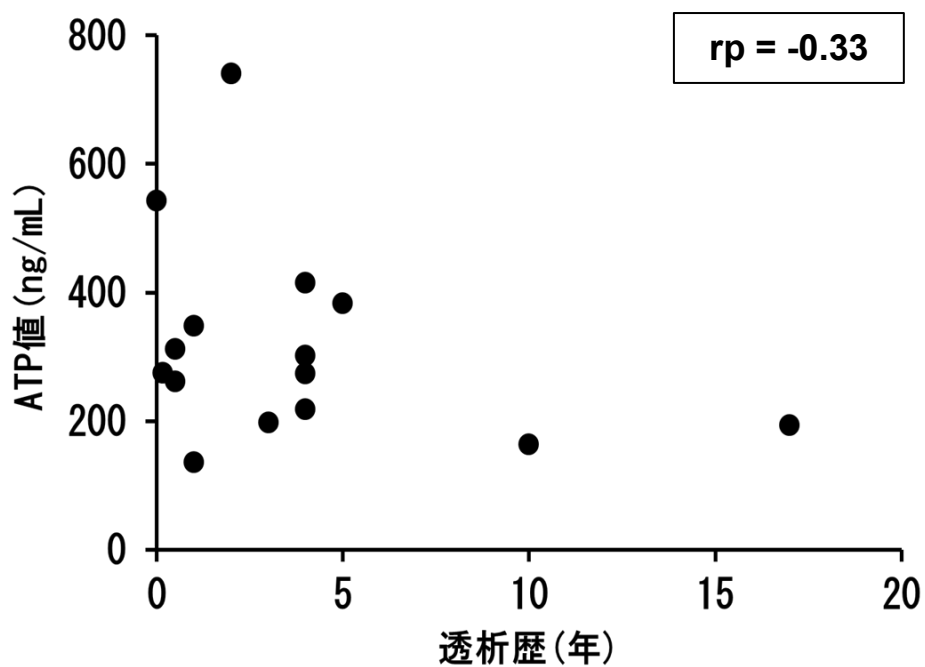


図 6 透析患者における末梢 CD4 陽性細胞の ATP 値と透析歴との関係

同様に、CKD 患者においても末梢 CD4 陽性細胞の ATP 値と S-Cre 値、年齢、あるいは eGFR 値との間に相関は認めなかった(図 7-9)。さらに各 CKD 群に分けて同様に検証を行なったが、相関は認めなかった。

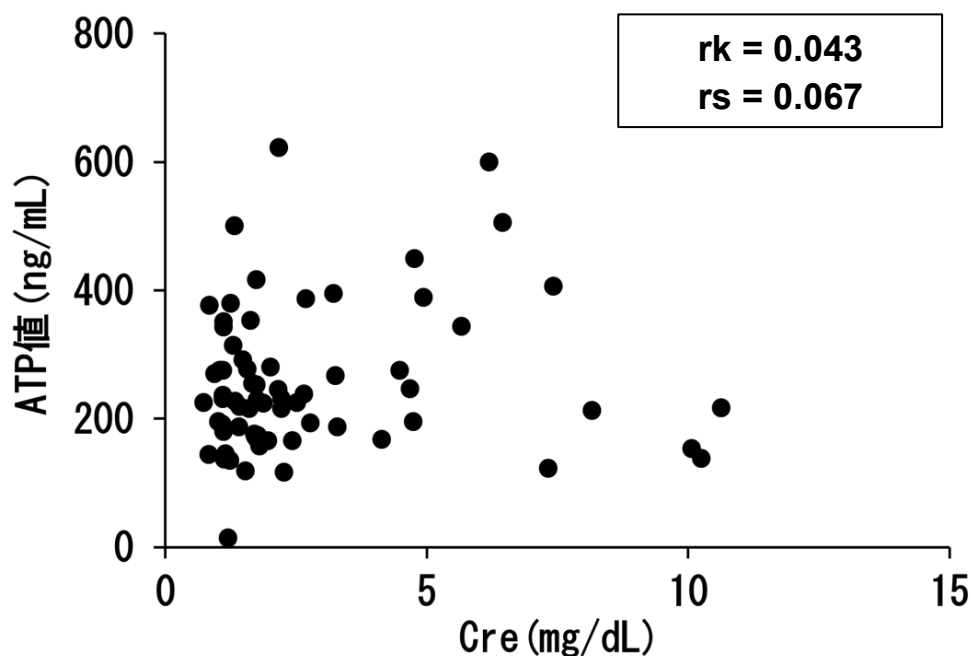


図 7 CKD 患者における末梢 CD4 陽性細胞の ATP 値と S-Cre との関係

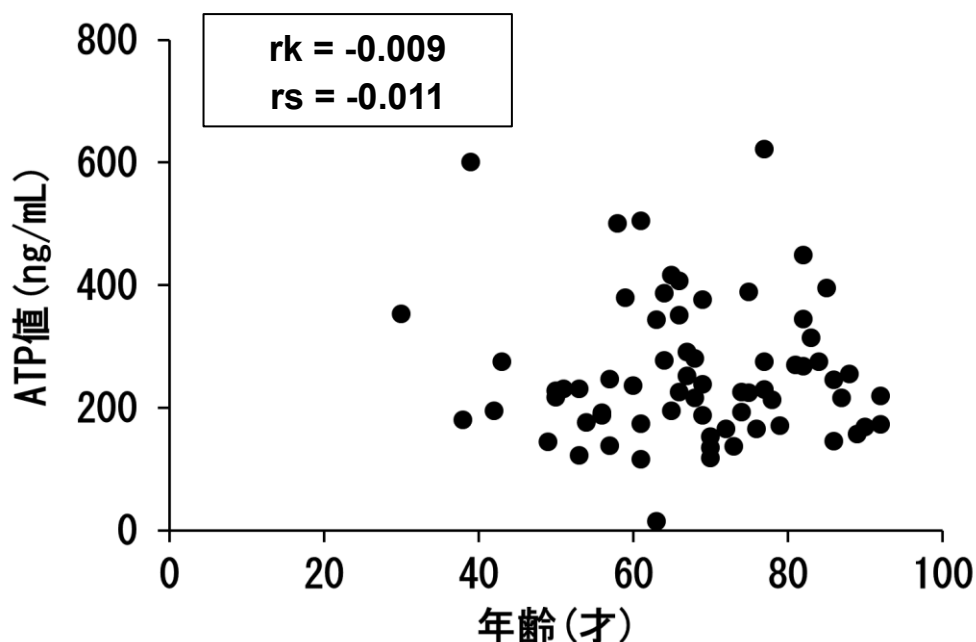


図 8 CKD 患者における末梢 CD4 陽性細胞の ATP 値と年齢との関係

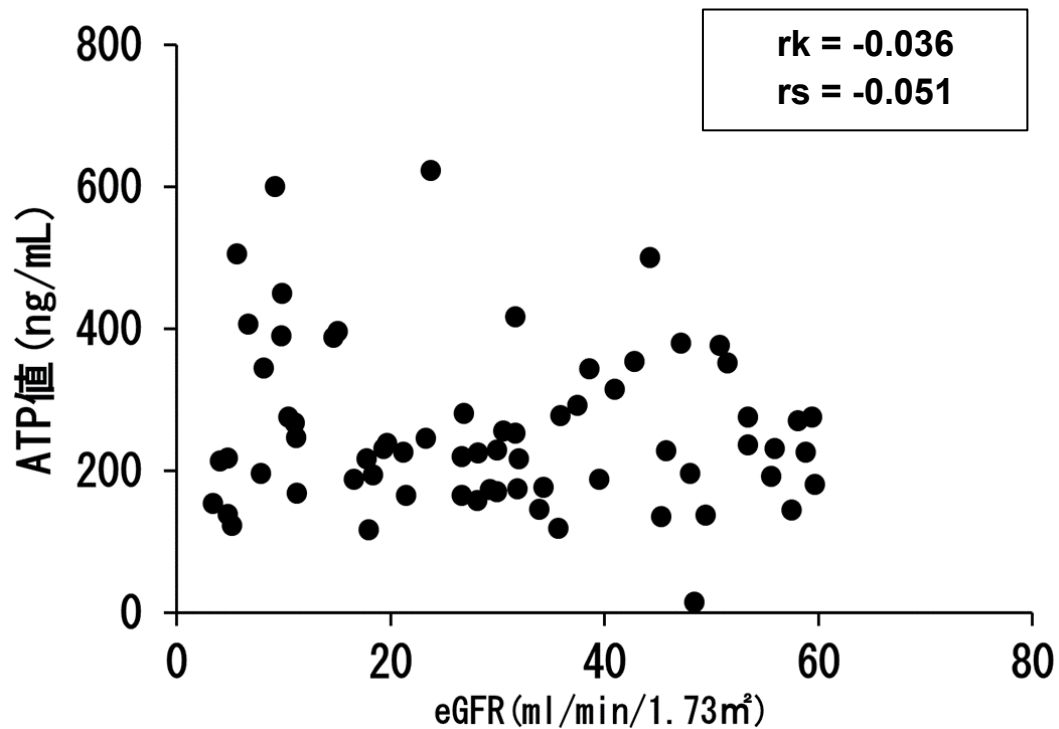


図 9 CKD 患者における末梢 CD4 陽性細胞の ATP 値と eGFR との関係

3. 糖尿病の既往と末梢 CD4 陽性細胞中の ATP 値との関連

最後に、透析患者および G3b、G4、G5 群の CKD 患者を、それぞれ糖尿病性腎症の既往の有無によって 2 群に分け、両群間で末梢 CD4 陽性細胞の ATP 値を比較検討した(表 3)。いずれの群においても、糖尿病性腎症の既往が有る患者と既往の無い患者群間で、ATP 値に有意な差は認めなかった(Mann Whitney U 検定)。

表 3 糖尿病性腎症既往の有無と末梢 CD4 陽性細胞の ATP 値との関係

| 疾患名 | ステージ | ATP平均値(SD)(ng/mL) | 原疾患 | |
|-----------------|------|-------------------|-----------------|------|
| 透析患者 (17 例) | | 335.4(105.8) | 糖尿病性腎症(9 例) |] NS |
| | | 287.9(192.2) | その他(8 例) | |
| CKD患者 (17 例) | G5 | 315.3(114.7) | 糖尿病性腎症(12 例) |] NS |
| | | 258.0(195.9) | その他(5 例) | |
| CKD患者 (17 例) | G4 | 245.3(157.0) | 糖尿病性腎症(8 例) |] NS |
| | | 232.1(73.2) | その他(9 例) | |
| CKD患者 (17 例) | G3b | 245.0(130.3) | 糖尿病性腎症(6 例) |] NS |
| | | 267.8(88.9) | その他(11 例) | |
| CKD患者 (17 例) | G3a | | 糖尿病性腎症(0 例) | |
| | | 225.9 (93.7) | その他(不明含む)(17 例) | |

第四節 考察

本章では、透析患者と CKD 患者における末梢 CD4 細胞中の ATP 値が健常者の場合と比較して低値を示したことから、これらの患者における末梢のヘルパー T 細胞活性が低く感染リスクが高いことを明らかとした。しかしながら、腎不全の軽症にあたる G3a、G3b、および G4 群の CKD 患者と健常者の間では ATP 値に有意差が認められたものの、腎不全の末期に相当する G5 群の CKD 患者および透析患者の ATP 値は健常者のそれと比較し有意差を認めなかった。

本章で用いた末梢血中の ATP 値測定法では、全血を PHA で刺激した後、CD4 陽性細胞を抗 CD4 抗体と結合させたマグネチックビーズで回収し、得られた細胞中の ATP 量を測定している。PHA は T 細胞マイトジェンとして知られ、また CD4 陽性細胞にはヘルパー T 細胞が含まれることから、本測定法では、末梢の活性化ヘルパー T 細胞数を間接的に反映しているものと思われる。

本章において検討した透析患者および G5 群の CKD 患者における末梢 CD4 細胞中の ATP 値には個人差が大きく、特に G5 群の CKD 患者では他の CKD 患者と比べて ATP 値が高値を示す患者が多かった。Readaelli らは、尿毒症の患者は窒素の異化代謝産物が保持されているためにクエン酸回路における ATP の産生が遅いと報告している²⁴⁾。しかしながら、今回の研究結果はその知見に相反

していた。Dounousi らは、尿毒症の病態や血液透析療法が、腎機能を低下させる酸化ストレスレベルを増加させること、および血漿中の 8-イソプロスタノール濃度や血清中の総抗酸化物質濃度 (total antioxidant status) と eGFR に相関があることを指摘している²⁵⁾。

末期腎疾患患者の免疫細胞は、貧血、カルシウムのリン酸化、代謝異常、栄養失調、酸化ストレス等の、尿毒症に関連する種々の危険因子に曝されている。炎症性サイトカインの一種であり、Th1 由来の免疫反応を抑える作用のある IL-10 は、末期腎不全患者でダウンレギュレーションされる一方、炎症を亢進させる IL-6 や TNF- α の産生量は末期腎不全患者で増加する²⁶⁾。つまり、今回 ATP 値の高値を示していた G5 群の CKD 患者のような末期腎不全患者においては、免疫細胞が尿毒症原因物質により酸化ストレスを受けて、CD4 陽性細胞のダウンレギュレーションが阻害されていたことで ATP 産生量が亢進していたと考察する。また、CD4⁺naiveT 細胞率と S-Cre 値との間には負の相関があり、Th2 および Th17 細胞は末期腎不全患者群において発現率が高い²⁷⁾。さらに、エフェクターメモリーT 細胞率やセントラルメモリーT 細胞率は S-Cre 値と正の相関があると報告されており、これらの知見からも、腎機能の低下が T 細胞の機能に影響を与えることがわかっている²⁷⁾。

本章で対照とした健常者群の年齢は、透析患者や CKD 患者群に比べて低かった。しかしながら、腎移植患者における免疫抑制薬の薬力学的パラメーターは年齢と相関しないことが報告されている²⁸⁾。本章では、各被験者において末梢 CD4 細胞中の ATP 値と年齢との間に相関が認められなかったことから、健常者群と患者群間の ATP 値の比較において年齢の差は影響しないものと思われる。

第五節 小括

透析患者と CKD 患者は、健常者に比べて末梢 CD4 細胞中の ATP 値が低値を示す傾向にあり、免疫能が低下して易感染状態である可能性が示された。特に、ステージが G3a の CKD 患者は、健常者より末梢 CD4 細胞中の ATP 値が有意に低値を示した。一方透析患者やステージの進行した末期腎不全患者では、尿毒症に由来する代謝産物や透析による免疫細胞の刺激が ATP 値に影響するため、これらの患者では ATP 値の個体差が大きかった。なお年齢、S-Cre 値、eGFR 値、および透析歴は、ATP 値には影響を与えないものと思われた。

これらの結果より、末梢 CD4 細胞中の ATP 値は、透析患者や CKD 患者の易感染性と感染リスクを把握し、感染症を未然にコントロールするためのバイオマーカーとなり得るものと思われた。また慢性腎不全患者は、CKD の早期の段

階から **ATP** 値が低下し易感染状態となっていることがわかり、早期より感染症コントロールを行うことで予後改善に貢献できる可能性が示された。さらには、腎移植後に免疫抑制薬物療法を受けた患者においても、末梢 **CD4** 細胞中の **ATP** 値をモニタリングすることにより、日和見感染症の発症を予測して予防的処置を施すことが可能になるものと考えられる。

第二章 健常者および透析患者の末梢血単核細胞の T 細胞マイトジェン応答性増殖に対するビタミン K1 および K2 の抑制効果

第一節 序論

腎不全患者は生命を維持する上で、生涯継続した血液透析を回避するには、もう一つの腎代替療法である腎移植を行う以外に選択肢はこれまでのところない。腎移植では、移植後の急性拒絶反応発症を予防するために、免疫抑制薬物療法が必須となる。

しかしながら、現行の免疫抑制薬物療法下においては、拒絶反応が発生する症例も少なからず見られる。また、過剰免疫抑制からなる日和見感染症やその他の重篤な副作用が、臨床上の大きな課題となっている。これらの課題を解決する手段の一つとして、新たな免疫抑制薬の開発が行われているが、その多くは分子標的薬や抗体薬が主であり、さらなる未知の副作用や、強力な免疫抑制作用に基づく日和見感染症や悪性腫瘍の発現がより一層懸念される。

そこで申請者は、腎疾患患者や腎移植患者等の治療に用いられている既存薬の中から、免疫抑制効果を有しあるいは既存の免疫抑制薬の効果を増強する可能性のある VK 類に着目し、本章の研究を実施した。

PBMC に対する抑制効果が報告されている VK3 は肝毒性の副作用があるため医薬品としては用いられていないが、VK1 や VK2 の PBMC 増殖抑制作用が認められれば、免疫抑制効果を期待したこれら薬物の臨床応用の可能性も見出される。

本章では、VK1 および VK2 の免疫抑制効果を健常者および透析患者の PBMC を用いて評価した。また、PBMC 抑制作用の機序を明らかにするために、健常者および透析患者の PBMC から放出される Th1/Th2/Th17 の 7 種のサイトカイン量に対する VK1 および VK2 の効果を検討した。さらに、制御性 T 細胞(Treg) に対する影響を確認するために、各種特異抗体で染色した T 細胞をフローサイトメトリー法にて解析した。

第二節 方法

1. 試薬

Roswell park memorial institute (RPMI) 1640液体培地と仔ウシ胎児血清(FBS) はSigma社から購入した。10000 Units/mLペニシリン + 10000 µg/mLストレプトマイシン混合液はギブコ社より購入した。Concanavalin A (Con A) は生化学工業社より購入した。VK1、VK2、dimethyl sulfoxide (DMSO)、およびエタノール

は、富士フィルム和光純薬工業株式会社より購入した。3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) は、Sigma社より購入した。その他全ての試薬は、可能な限り特級品を選択した。

2. 臨床研究としての承認

本研究は、「東京薬科大学ヒト組織等を研究活用するための倫理委員会」(15-16)および一般財団法人神奈川県警友会けいゆう病院の倫理審査委員会(H27-第22号)の承認を受けて実施した。研究対象者は、東京薬科大学の教員または学生の健常者、およびけいゆう病院に入院中の透析施行患者とした。本研究以前および研究期間中に免疫抑制薬(副腎皮質ステロイド、Ciclosporin、Tacrolimus、Azathioprine、Mycophenolate、Mizoribine)の服用または服用経験がある者は、被験者から除外した。

被験者の内訳は、健常者 12 名(男 4 名、女 8 名、平均 23.8 歳)および透析患者 12 名(男 10 名、女 2 名、平均 71.7 歳)であった。

これらの被験者に対して研究計画や内容を十分に説明し、文書にて事前同意を得た。透析患者の採血のタイミングは透析施行直前とし、ヘパリンナトリウムを添加したベノジェクトⅡ真空採血試験管 VP-H100K に静脈血 20 mL を採血した。各被験者からの採血の回数は 1 回のみとした。

3. PBMC の分離培養法と細胞増殖判定法

PBMC を分離するために、リンパ球分離液 4 mL を試験管に取り、その上にヘパリン血 5 mL を静かに重層した後、23 °C で 2300 rpm, 20 分間遠心分離を行った。遠心分離後、PBMC 層を分取し、RPMI1640 培地で 2 回洗浄した後、PBMC を 5 mL の培地に懸濁させた。これを血球計算盤上に分取し、倒立光学顕微鏡にて細胞数を数え、 1.075×10^6 cells/mL となるように培地で希釈し、これを PBMC 懸濁液とした。その後、96 穴滅菌平底プラスチックプレートに T 細胞マイトジェンとして Con A を最終濃度が 5 μ g/mL となるように添加し、PBMC 懸濁液を 96 穴滅菌平底プラスチックプレートの各 well に 186 μ L ずつ分注した。そこに VK1 または VK2 のエタノール溶液を、最終濃度が 0.1、1、10、または 100 μ M となるようにそれぞれ添加した。プレートごと 5 %CO₂ 存在下に 37 °C で 4 日間培養した。

培養 4 日目に、MTT を生理食塩水に 5 mg/mL 溶解した溶液を各ウェルに 10 μ L 添加し、5 %CO₂、37 °C でさらに 4-5 時間培養した。プレートを 375 g で 5 分間遠心分離し、増殖した細胞内で生じたフォルマザンを沈殿させた。上清を各ウェルから取り除き、DMSO を 175 μ L 添加した後、マイクロシェーカー上で 10 分間振盪して、フォルマザン結晶を溶解させた。マイクロプレートリーダー

を用いて、550 nm で吸光度を測定した。

4. PBMC 培養上清中の Th1/Th2/Th17 サイトカイン濃度の測定

PBMC 懸濁液を、5 µg/mL の Con A と一連の濃度の VK1 または VK2 の存在下で 96 時間培養した後、培養上清を採取してサイトカイン測定まで -80 °C で保存した。

培養上清中に分泌された 7 種類の Th1/Th2/Th17 サイトカインの濃度を、Human Th1/Th2/Th17 サイトカインキットを用いたビーズアレイ・フローサイトメトリー法で測定した。

5. PBMC 中の CD4⁺細胞、CD4⁺CD25⁺細胞、および CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞の測定

Con A の存在下で VK1 および VK2 で 96 時間処理した PBMC を、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 回洗浄した。次いで、FITC マウス抗ヒト CD4 抗体試薬 10 µL および APC マウス抗ヒト CD25 抗体試薬 10 µL を添加した。これらの細胞懸濁液を暗所にて 37 °C で、20 分間静置させた。その後、細胞を PBS で洗浄し、1 mL の PBS で再懸濁した。Human Foxp3 緩衝液 A 1 mL を蒸留水で 10 倍に希釈し、細胞懸濁液に加え、室温暗所で 10 分間置いた。細胞を PBS で洗浄し、10 倍希釈した Human Foxp3 Buffer A で希釈した Human Foxp3 Buffer B 0.2 mL を用いて懸濁し、室温暗所で 30 分間静置した。1 mL の PBS を加え、5 分間遠心分離した。上清を除去し、細胞を PBS で洗浄した。その後、Alexa Fluor® 488 Mouse 抗ヒト Foxp3 抗体 10 µL を添加し、細胞懸濁液を暗所 37 °C で 30 分間静置した。細胞を PBS で洗浄した後、細胞懸濁液に 0.4 mL の染色緩衝液を添加し、フローサイトメトリーで解析した。

データは、BD FACSDiva™ および FACSCanto™ を用いて解析した。リンパ球画分中の CD4⁺細胞をゲーティングし、さらにリンパ球画分中の CD4⁺CD25⁺細胞 および CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞の比率を算出した。

第三節 結果

1. T 細胞マイトジェンで刺激した PBMC の増殖に対する VK1 および VK2 の効果

VK1 は、Con A で刺激した健常者 PBMC および透析患者 PBMC に対し、細胞増殖抑制効果を示さなかった (図 10、11)。一方 VK2 は、いずれの被験者の PBMC に対しても、濃度依存的な増殖抑制効果を示した (図 10、11)。

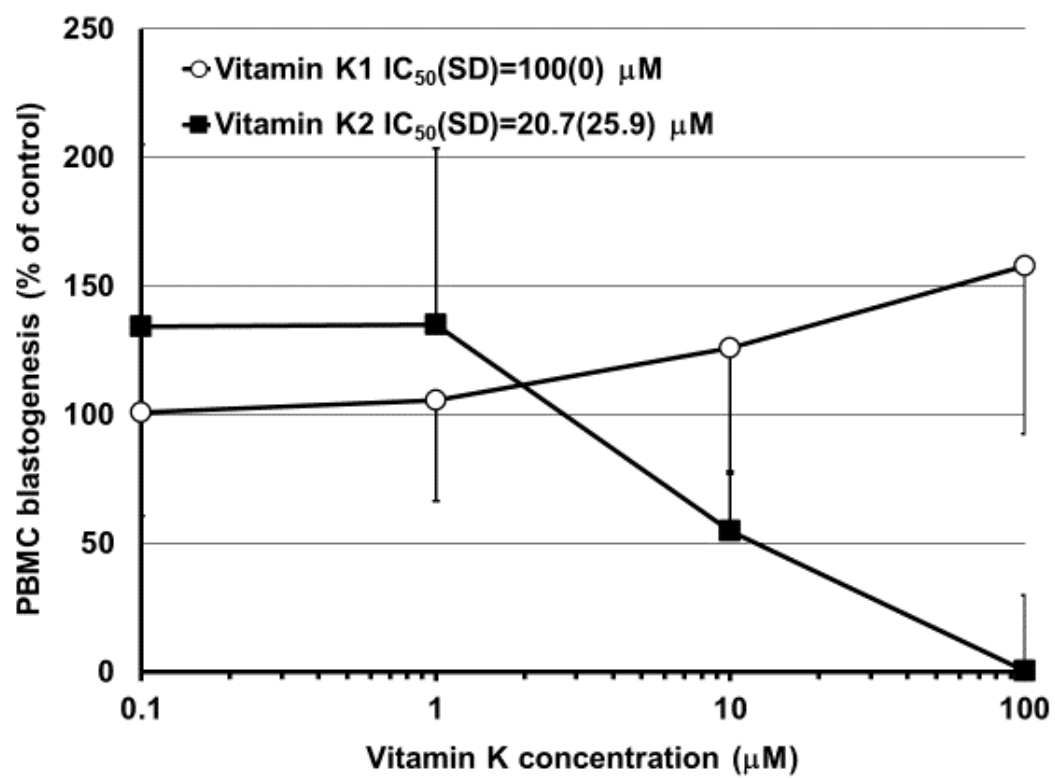


図 10 健常者 PBMC の Con A 応答性増殖に対する VK の効果

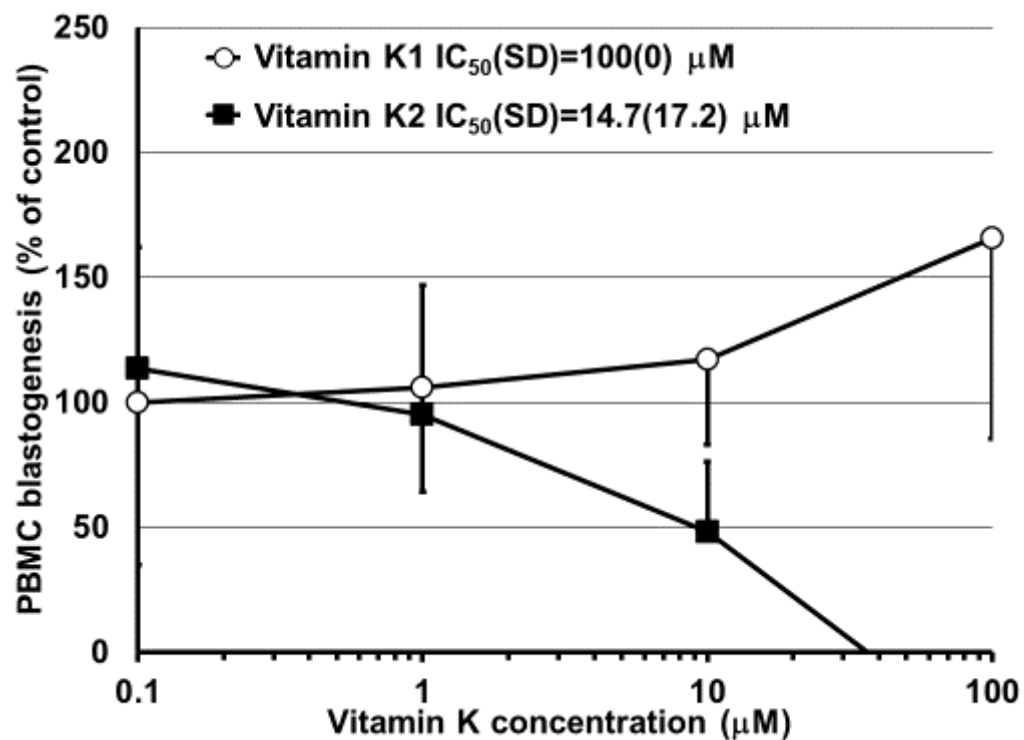


図 11 透析患者の PBMC の Con A 応答性増殖に対する VK の効果

健常者 PBMC の Con A 応答性増殖に対する VK2 の IC₅₀ 値は平均 20.7 (標準偏差 SD は 25.9) μmol/L であった。一方、透析患者 PBMC の Con A 応答性増殖に対する VK2 の IC₅₀ 値 (SD) は 14.7 (17.2) μmol/L であった。両群の PBMC 増殖に対する VK2 の IC₅₀ 値を比較したところ、群間に有意な差はなかった (Mann Whitney U 検定、図 12)。

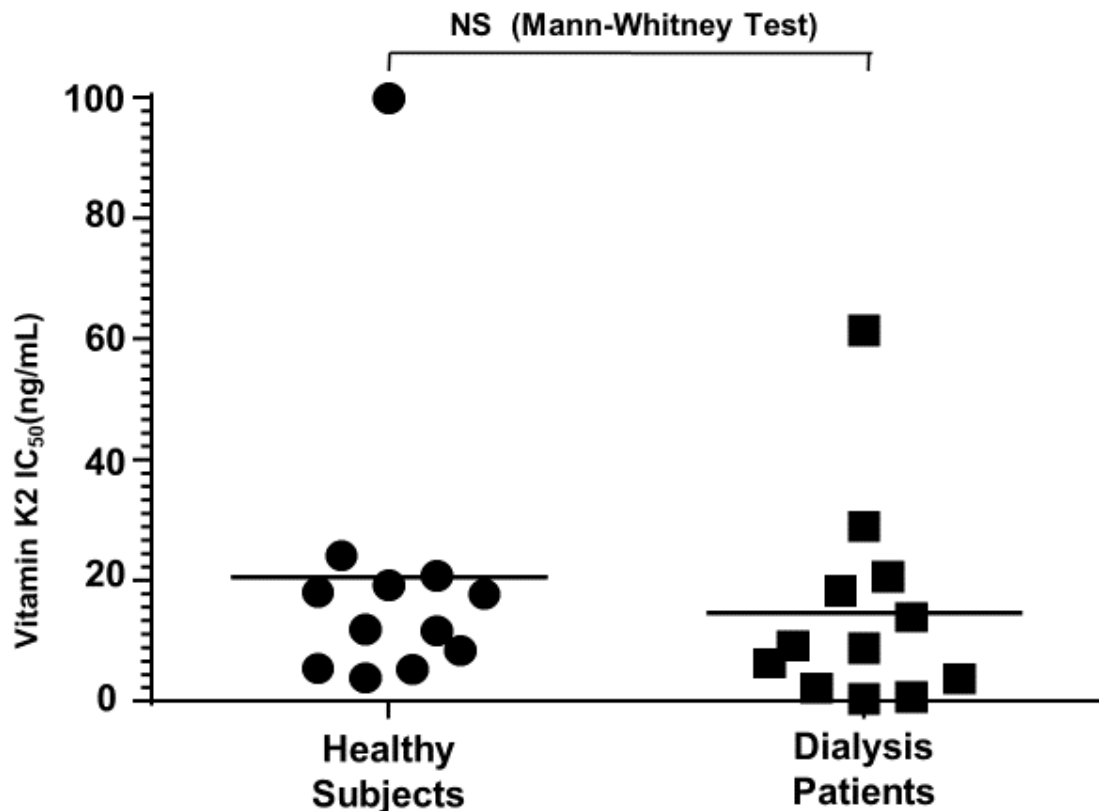


図 12 健常者と透析患者の PBMC の Con A 応答性増殖に対する VK2 の IC₅₀ 値の比較

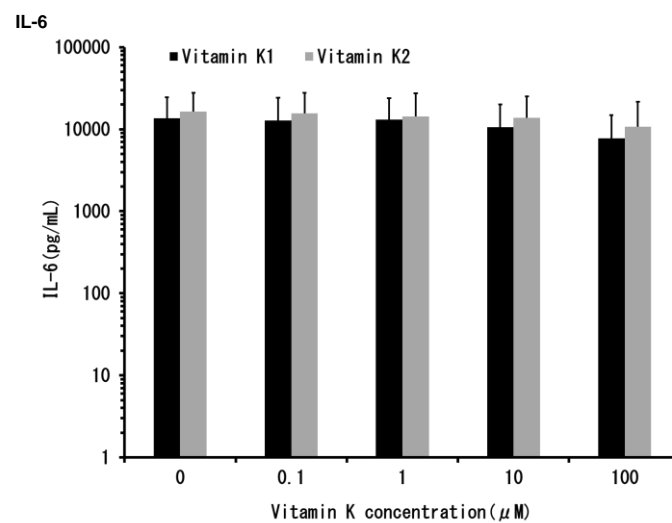
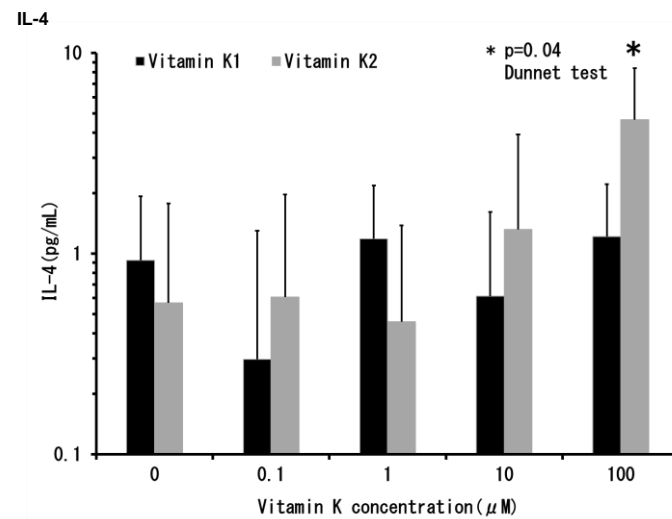
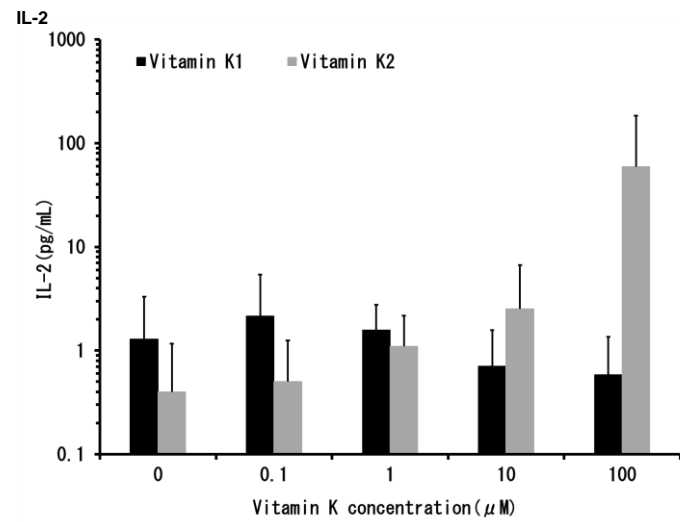
2. Th1/Th2/Th17 由来の 7 種のサイトカインの分泌量に対する VK の効果

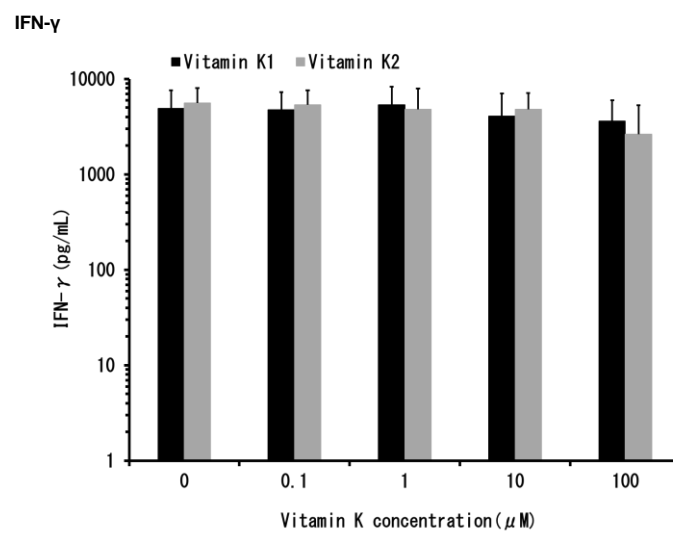
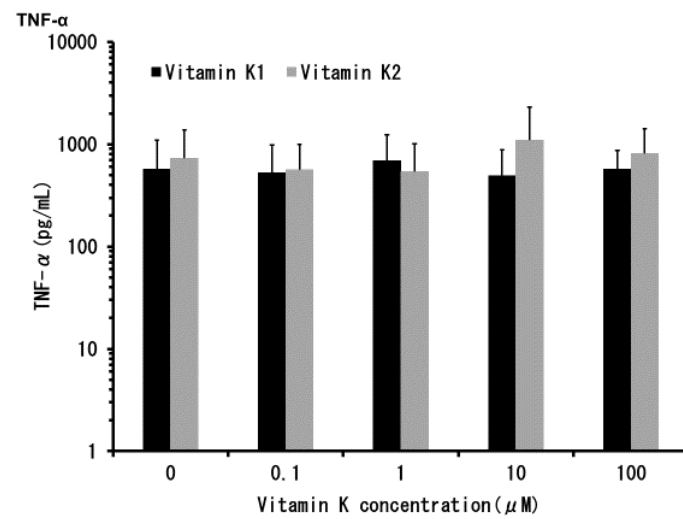
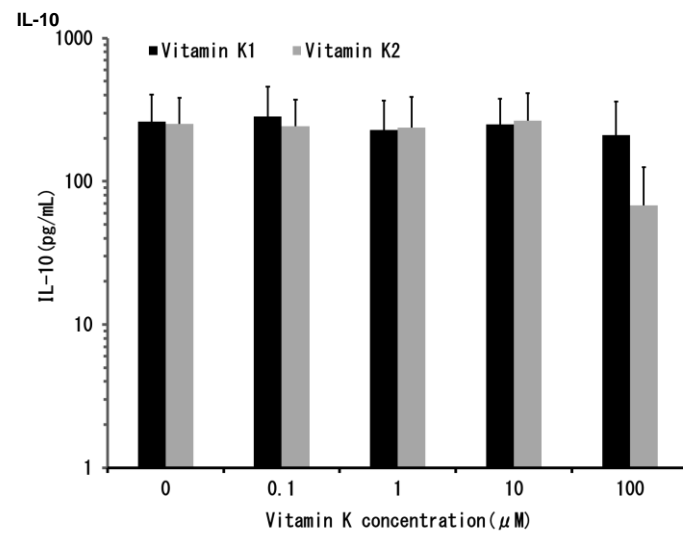
健常者および透析患者の PBMC を Con A および 0.1-100 μ M の VK 存在下に培養後、培養上清中に分泌された 7 種の Th1/Th2/Th17 由来サイトカインすなわち IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF- α 、IFN- γ 、および IL-17 の量を、ビーズアレイ・フローサイトメトリー法を用いて定量した(図 13、14)。

VK1 は検討したいずれの濃度においても、健常者および透析患者の PBMC からのサイトカインの分泌量に影響を与えなかった(図 13、14)。

VK2 は、Th2 サイトカインである IL-4 の健常者 PBMC からの分泌量を増加させたが(図 13)、その他のサイトカインの分泌量には影響を与えなかった。

VK2 は高濃度において、透析患者の PBMC からの IL-10、TNF- α 、IFN- γ あるいは IL-17 の分泌量を抑制する傾向を示したが、この効果は有意なものではなかった(図 13、14)。またその他のサイトカインの分泌量にも、有意な影響を与えなかった。





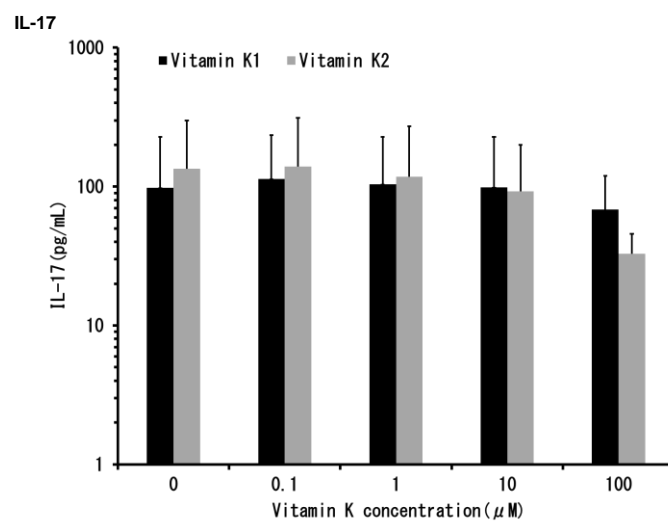
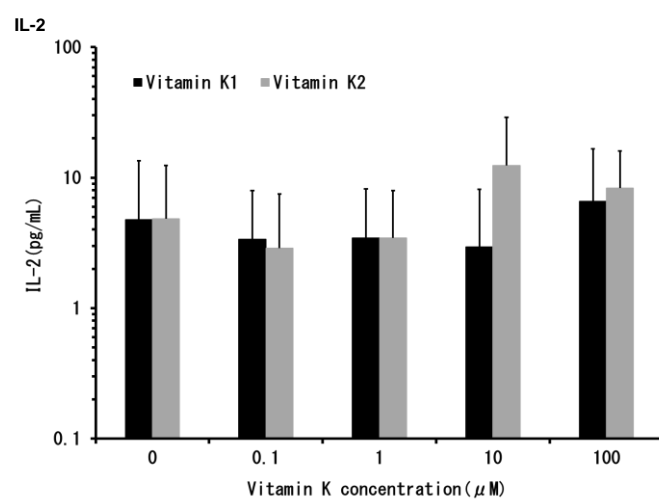
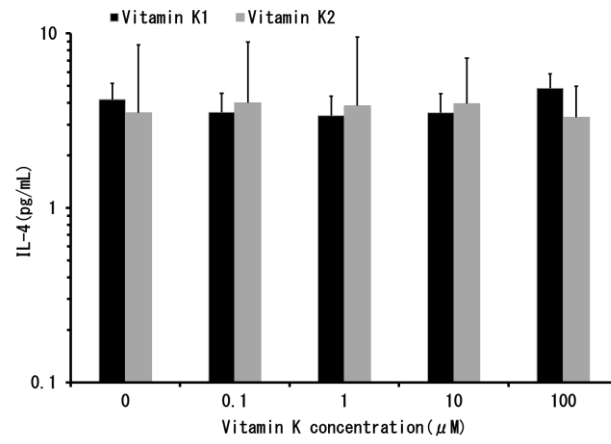


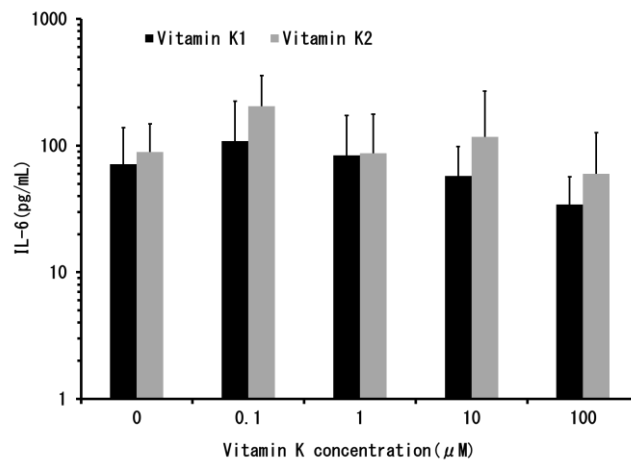
図 13 健常者 PBMC からの Th1/Th2/Th17 由来サイトカインの分泌量に対する VK の効果



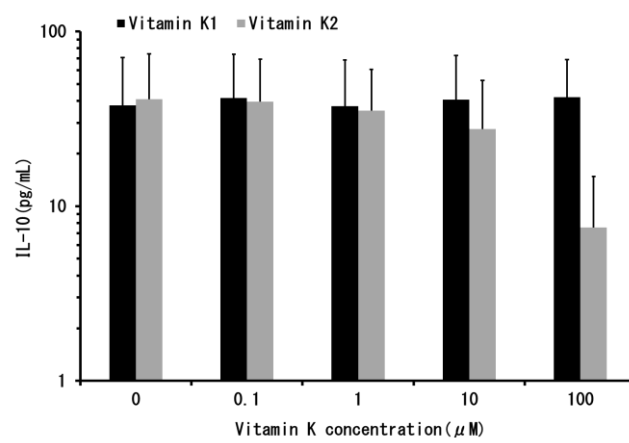
IL-4



IL-6



IL-10



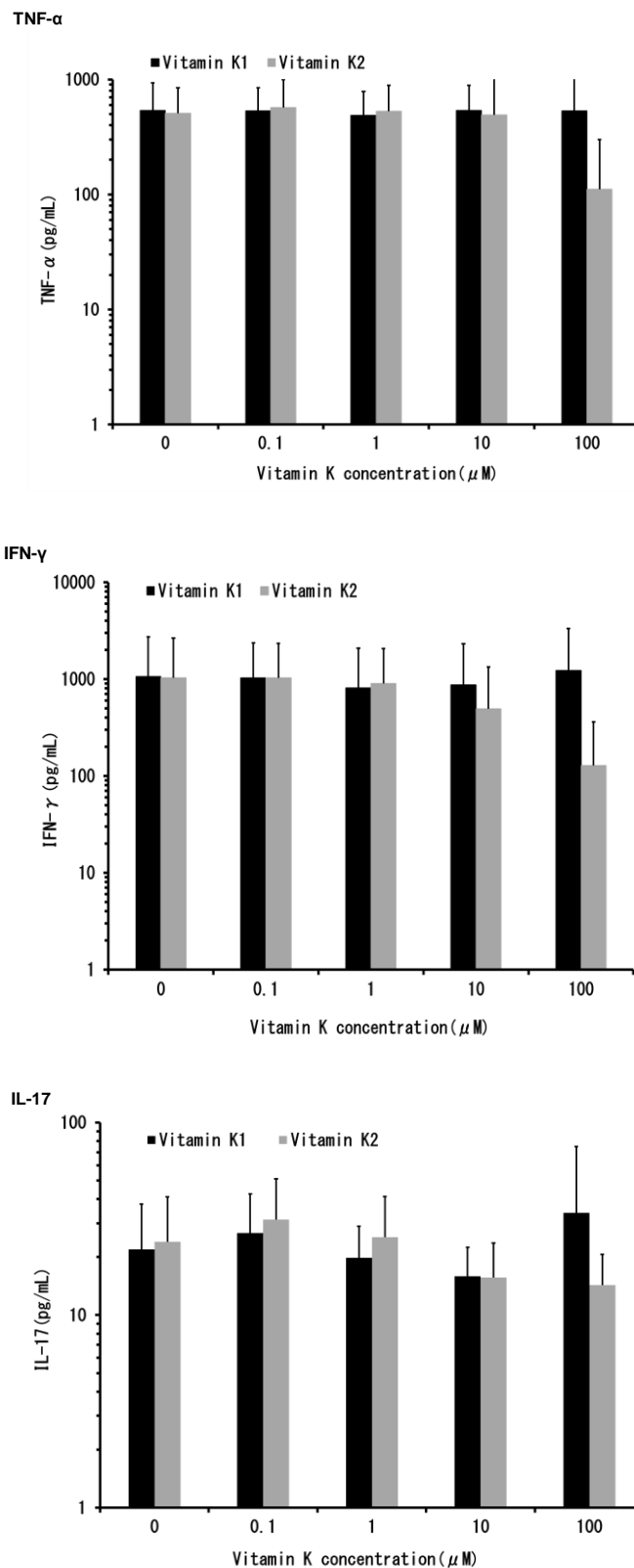


図 14 透析患者 PBMC からの Th1/Th2/Th17 由来サイトカインの分泌量に対する VK の効果

3. PBMC 中の CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 率に及ぼす VK の影響

VK1 および VK2 は、健常者と透析患者どちらの PBMC 中の CD4⁺細胞および CD4⁺CD25⁺細胞率にも、有意な影響を及ぼさなかった(結果未掲載)。しかしながら、VK2 は PBMC 中の CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞 (Treg) 率を減少させた。健常者と透析患者の PBMC に及ぼす影響を比較すると、透析患者においてより低濃度の VK2 が CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞率を強くかつ有意に抑制した(図 15、16)。

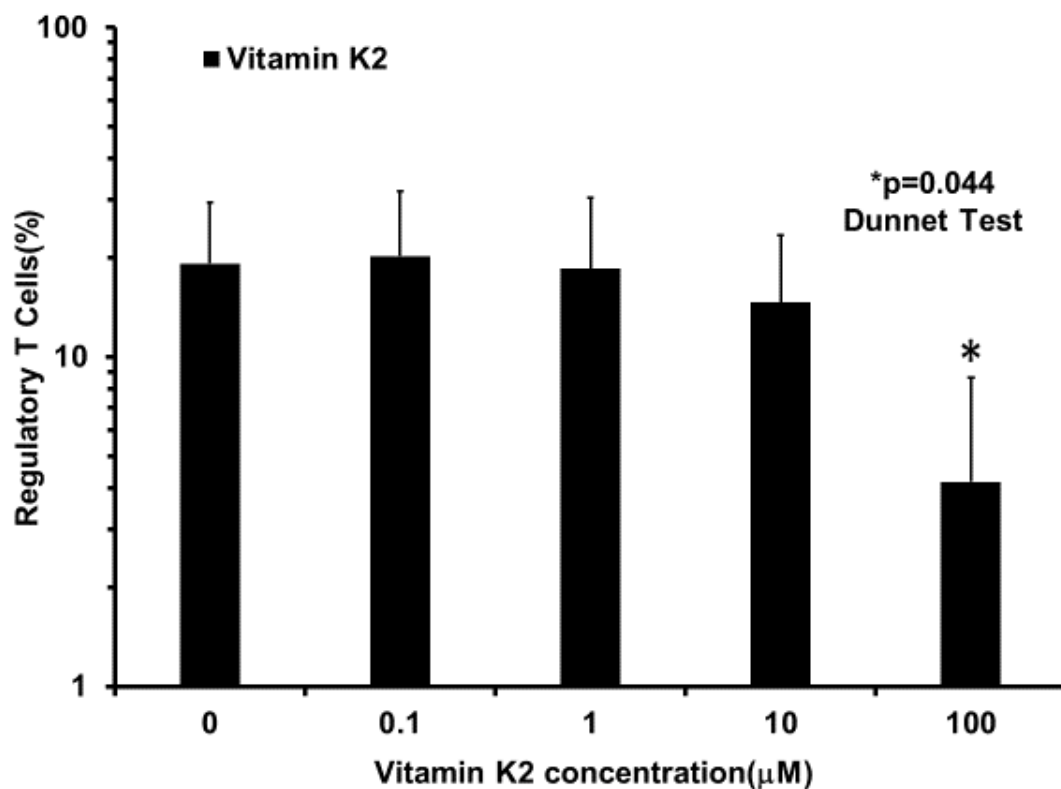


図 15 健常者の PBMC 中の CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Treg) 細胞率に及ぼす VK2 の影響 * VK2 で処理していない細胞 (VK2 0 μM) と比べて、Dunnett 検定により p=0.044

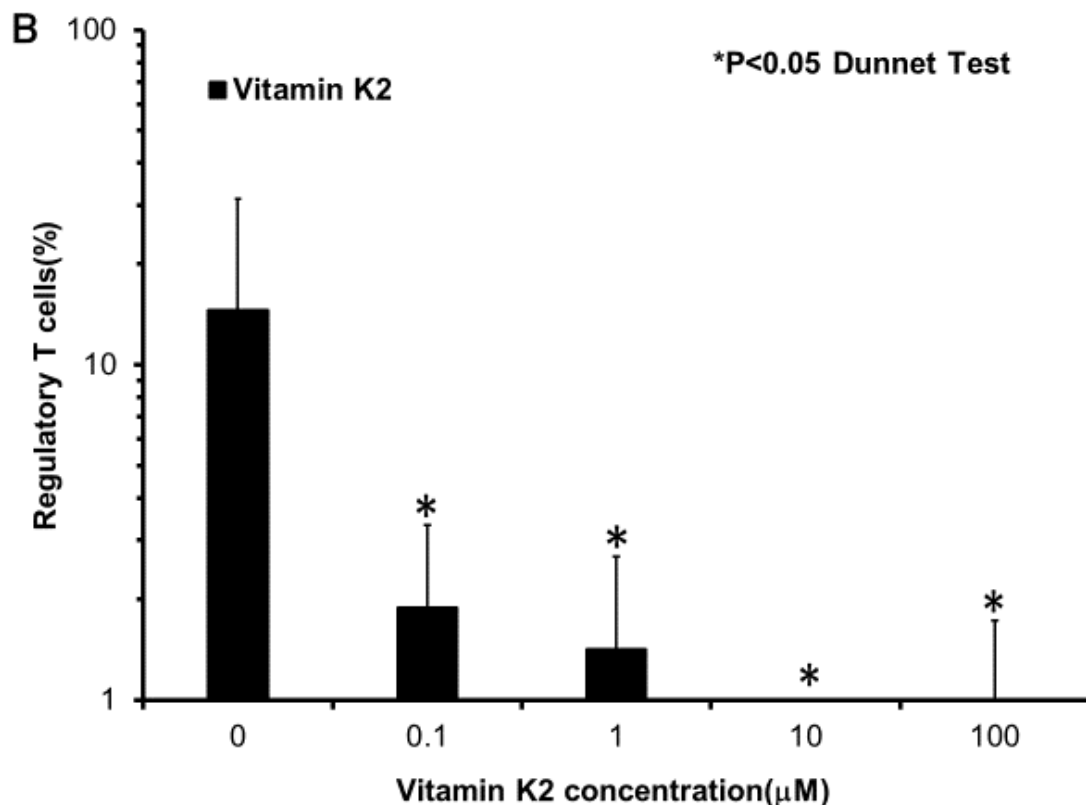


図 16 透析患者の PBMC 中の $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (Treg) 細胞率に及ぼす VK2 の影響 * VK2 で処理していない細胞 (VK2 0 μ M) と比べて、Dunnett 検定により $p < 0.05$

第四節 考察

本章では、VK1 と VK2 の免疫抑制作用を確認するために、健常者および透析患者の PBMC の T 細胞マイトジェン応答性増殖に対する抑制効果を、MTT 法により検討した。

VK1 には PBMC 増殖抑制効果は認められなかったが、VK2 は両群の PBMC 増殖に対して用量依存的な抑制効果を示した。VK2 は、本邦において骨粗鬆症の治療に適応をもつ医療用医薬品である。副腎皮質ステロイドによる免疫抑制療法を受けている患者に対して VK2 を併用すれば副腎皮質ステロイドの免疫抑制作用を増強し、一方でその副作用の骨粗鬆症を軽減できるため、有益に働くと考えられる。

VK2 は、骨粗鬆症治療薬として成人に用いられる場合その用量は 15 mg/day と定められており、至適血中濃度の範囲は 200-300 ng/mL とされている。しか

しながら、本章において明らかとした PBMC 増殖に対する VK2 の IC₅₀ 値は 4000-5000 ng/mL であり、これは骨粗鬆症の治療で用いる投与量によって得られる血中濃度の約 20 倍に相当する。そのため、VK2 単剤によって十分な免疫抑制効果を得ることは困難と思われるが、副腎皮質ステロイドを含む他の免疫抑制薬と併用すれば、相乗効果が得られる可能性がある。副腎皮質ステロイドとの併用で同薬の減量が叶えば、重篤な副作用である日和見感染症やステロイド誘発性骨粗鬆症のリスクの低減に寄与しうると推察する。

畑中らは、VK3 および VK5 が PBMC の Con A 応答性増殖を強く抑制する機序として、これら VK が PBMC からの IL-4、IL-6、IL-10、TNF- α 等のサイトカイン産生を阻害する効果を挙げている¹⁵⁾。しかしながら、本章の結果によれば、VK1 にサイトカイン産生抑制効果は皆無であり、また VK2 は IL-4 のみ産生を促進させるに留まった。つまり、VK2 が Th1/Th2/Th17 由来サイトカイン産生に及ぼすメカニズムは、VK2 の Con A 応答性 PBMC 増殖抑制作用への寄与が少ないものと考えられた。

VK1、VK2、および VK3 は、共通の基本骨格となる 2-メチル-1, 4-ナフトキノン環を有する。VK1 および VK2 は側鎖にフィチル基とプレニル基をそれぞれ持つが、VK3 や VK5 には同様な側鎖は存在しない(12 頁、図 1 参照)。本章の結果、VK1 には PBMC 増殖抑制効果がなく一方で VK2 にはこの作用が認められたことから、側鎖の 2 重結合がその効果に関与していると考えられる。また、サイトカイン産生に対する効果に関しても、VK1 および VK2 と VK3 および VK5 の間で、側鎖の有無が効果の違いに寄与していると推測される。

Alendronate および Risedronate を代表とするビスホスホネート製剤は、腰椎および頸椎の骨ミネラル密度の低下を防ぐことが示されている²⁹⁻³¹⁾。そのためこれらの薬物は、日本骨代謝学会が制定するステロイド性骨粗鬆症の管理と治療のガイドラインにおいて第一選択とされている¹⁶⁾。

VK2 は骨粗鬆症の治療に対して従来から使われているが、ステロイド性骨粗鬆症のガイドラインにおいては推奨されていない。しかしながら本章の結果は、VK2 が長期ステロイド服用患者に対してステロイドと共に相乗的な免疫抑制効果をもたらす可能性が考えられた。一方 VK2 は、自己免疫疾患患者におけるステロイド性骨粗鬆症に対して、骨代謝回転を改善するとの報告がある³²⁾。さらに、リウマチ性関節炎患者において、VK2 を 3 か月間服用後に CRP、MMP-3、DAS28-CRP 等の治療マーカーの減少が認められたことが報告されている³³⁾。それゆえ、VK2 はリウマチ性関節炎の患者に対して、骨粗鬆症に対する治療効果だけでなくリウマチの臨床的検査データの改善も期待できる。

CD4 陽性 T 細胞は種々の免疫反応や炎症に関与し、Th1/Th2/Th17 および Treg などは CD4 陽性細胞群に分画される。Treg は、過剰な免疫反応を制御する役割

を担っていると考えられているが、その詳細な機能については不明な部分も多い。Lang は、透析患者では Th17 細胞が増加しているのに対し、Treg 数は減少していると報告している³⁴⁾。また彼らは、Th17 細胞および Treg の分化と血中リン酸塩値、アルブミン値、あるいは年齢との間に有意な相関を認めている³⁴⁾。本章では、VK2 が健常者の末梢リンパ球に比べて透析患者のリンパ球において、Treg 率をより強く抑制することを示した。このことから、腎不全の病態や透析療法によって免疫機能が過剰に抑えられている患者に対しては、VK2 の併用による副次的な Treg の抑制は感染制御の観点において有利に働く可能性がある。なお、VK2 が Treg 細胞率を減少させた機序は不明だが、以上の結果から PBMC のマイトゲン応答性増殖に対する VK2 の抑制効果における Treg の関与は少ないものと考えられた。

第五節 小括

VK2 が、健常者および透析患者の PMBC の T 細胞マイトゲン応答性増殖を抑制することを示した。一方 VK1 にはその作用は認められなかった。VK2 は、両被験者群の PMBC からの Th1/Th2/Th17 関連サイトカイン産生に対し、ほとんど影響を及ぼさなかった。一方 VK2 は、PBMC 中の Treg 率を減少させ、この効果は特に透析患者の PBMC に対して強く現れた。

VK2 は副腎皮質ステロイド薬と併用することで相乗的免疫抑制効果を生み、ステロイドの減量を期待でき、VK2 自身の骨粗鬆症改善作用と併せ、副腎皮質ステロイド薬の副作用である骨粗鬆症のリスクを低減できるものと考えられた。

第三章 植物由来アルカロイドのテトランドリンおよびその類縁体の T リンパ球抑制効果に関する検討

第一節 序論

Xu らは、天然物の Tetrandrine (Tet) が NF- κ B との作用を介して、ヒト T 細胞の *in vitro* 増殖や透析患者 PBMC の T 細胞マイトジェン応答性増殖を抑制することを報告している¹⁹⁾。また Xu らは、Tet が Methylprednisolone との併用において、P 糖タンパク質の阻害を介し Methylprednisolone の免疫抑制効果を向上させる可能性を示している³⁵⁾。日本では、Tet の類縁化合物 4 種を有効成分とする医療用医薬品のセファランチン[®]が臨床で用いられている。そのため、それら類縁化合物にも免疫抑制効果を確認することができれば、Tet 類縁体の臨床応用への可能性が生じる。

Isotetrandrine (Iso-Tet) は、Tet と 1 か所の不斉炭素原子の立体配置が異なる立体異性体である(13 頁、図 2 参照)。本章では、ヒト T リンパ芽球性白血病細胞、健常者 PBMC、および透析患者 PBMC を用いて、Tet 類縁体である Iso-Tet の T 細胞抑制効果を検討するとともに、その作用機序について NF- κ B に着目した解析を試みた。また、より優れたリード化合物を創出することを目的とし、7 種の Tet 類縁体の構造活性相関解析を行った。

第二節 方法

1. 臨床研究の承認

本研究は、「東京薬科大学ヒト組織等を研究活用するための倫理委員会」(19-18)、一般財団法人神奈川県警友会けいゆう病院の倫理審査委員会(H28-第 14 号)、および亀田病院倫理委員会(令和 2 年 1 月 20 日)の承認を受けて実施した。

2. 研究対象者

健常者、けいゆう病院に入院中の透析施行患者、および亀田病院に透析通院中の患者を対象として、末梢血を採取し研究に用いた。全被験者に対し、研究内容を説明し、文書にて事前同意を得た。採血法については、第一、二章で述べた方法に準じた。尚、本研究以前および研究期間中に免疫抑制薬(副腎皮質ステロイド、Ciclosporin、Tacrolimus、Azathioprine、Mycophenolate、Mizoribine)の服用がある者は、研究の対象から除外した。

3. 試薬

Tet は SIGMA 社より、Iso-Tet は Santa Cruz Biotechnology 社より、各々購入した。Fangchinoline、Berbamine および Dauricine は、Wuhan ChemFaces Biochemical 社より購入した。Cepharanthine と armepavine は、Cayman Chemical Company より購入した。DMSO は和光純薬より、RPMI 1640 と FBS は Gibco BRL 社より購入した。Con A は生化学工業社より購入した。Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) は Sigma 社より、Anti NF- κ B antibody は Cell Signaling Technology 社より、Anti p-NF- κ B antibody は Santa Cruz Biotechnology 社より、また β -actin antibody は Proteintech Group より購入した。

ヒト T リンパ芽球性白血病 MOLT-4 細胞株は、DS Pharma Biomedical 社より購入した。MOLT-4/DNR 細胞は、Liu らの方法に従い、MOLT-4 細胞を低濃度から高濃度の Daunorubicin (DNR) に 3 か月以上かけて段階的に暴露させて得た^{36,37)}。その他全ての試薬は、可能な限り特級品を用いた。

4. PBMC の分離培養法および細胞増殖判定法

第二章、第二節 3 で述べた方法に従って実施した。第三章、第三節 1 における Tet および Iso-Tet の IC₅₀ 値を、第三章、第三節 3 の構造活性相関解析のための Tet および Iso-Tet の IC₅₀ 値として用いた。

5. MOLT-4 細胞および MOLT-4/DNR 細胞の培養法

各細胞株細胞を、10 %FBS、100,000 IU/L ペニシリンおよび 100 mg/L ストレプトマイシンを含む RPMI-1640 培地に 1.5×10^5 細胞/mL となるように懸濁させ、その 198 μ L を 96 穴プレートの各ウェルに分注した。各ウェルの細胞懸濁液に、2 μ L の Tet または Iso-Tet 溶液を添加し、5 %CO₂ 存在下に 37 °C で 48 時間培養した。

6. NF- κ B 発現のウェスタンブロット解析

1.0×10^6 細胞/mL の各細胞株細胞懸濁液 1980 μ L を 6 穴プレートの各ウェルに分注し、10 μ M の Tet およびその類縁体の溶液を各々添加した後、5 %CO₂ 存在下に 37 °C で 2 時間培養した。続いて、最終濃度が 50 ng/mL になるように phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) を添加し、さらに 30 分間培養後、細胞を PBS で洗浄した。洗浄細胞をプロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤を含む RIPA 緩衝液で抽出し、タンパク質画分を得た。タンパク質濃度は Pierce BCA Protein Assay Kit を用いて定量した。10 μ g のタンパク質溶解液を 10 %ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離後、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に転写した。5 %スキムミルクで 1 時間ブロッ

キングした後、膜を個々のタンパク質に対する一次抗体存在下に 4 °Cで一晩インキュベートし、さらに二次抗体存在下に室温で 1 時間放置した。タンパク質バンドは、ECL または ECL Prime Western Blotting 検出キットを用いて検出した。シグナルは、発光画像分析装置 (version 1.52e, National Institutes of Health, USA; <http://imagej.nih.gov/ij>) を用いて解析した。

第三節 結果

1. MOLT-4 細胞、MOLT-4/DNR 細胞および健常者、透析患者の PMBC に対する Tet および Iso-Tet の細胞増殖抑制効果

ヒト T リンパ芽球性白血病 MOLT-4 細胞の *in vitro* 増殖に対する Tet と Iso-Tet の平均 IC₅₀ 値はそれぞれ 4.43±0.22 μM および 2.19±0.27 μM であり、Iso-Tet の方が有意に強い細胞増殖抑制効果を示した (p=0.0022) (図 17)。

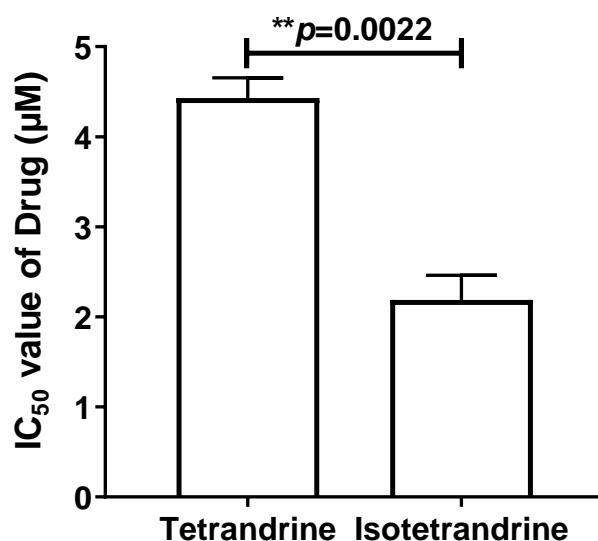


図 17 MOLT-4 細胞に対する Tet と Iso-Tet の増殖抑制効果 (IC₅₀ 値) の比較

段階的に濃度を増加させた DNR の存在下に 3 か月間培養して DNR 耐性を獲

得させた MOLT-4 細胞 (MOLT-4/DNR 細胞)³⁶⁾ に対しても、同様に Tet と Iso-Tet は増殖抑制効果を示した。Tet と Iso-Tet の平均 IC₅₀ 値は、それぞれ 3.62±0.22 μM および 2.28±0.33 μM であり、Iso-Tet の方が有意に強い増殖抑制効果を示した (p=0.0087) (図 18)。

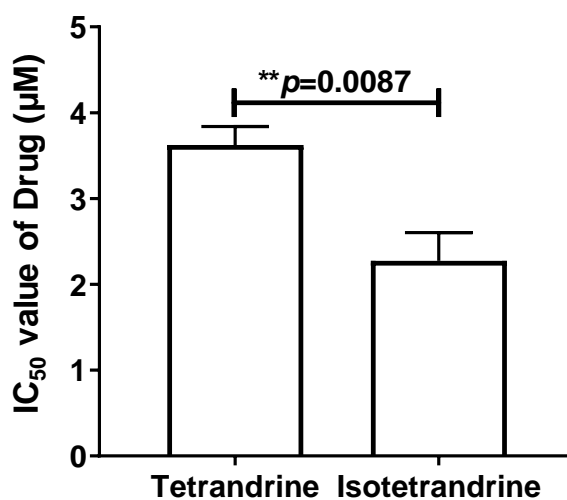


図 18 MOLT-4/DNR 細胞に対する Tet と Iso-Tet の増殖抑制効果 (IC₅₀ 値) の比較

次に、健常者 PBMC の T 細胞マイトジェン応答性増殖に対する、Tet および Iso-Tet の効果を検討した。各化合物の平均 IC_{50} 値はそれぞれ $1.92 \pm 0.22 \mu M$ と $1.29 \pm 0.14 \mu M$ であり、Iso-Tet は Tet より有意に強い抑制効果を示した ($p=0.0411$) (図 19)。

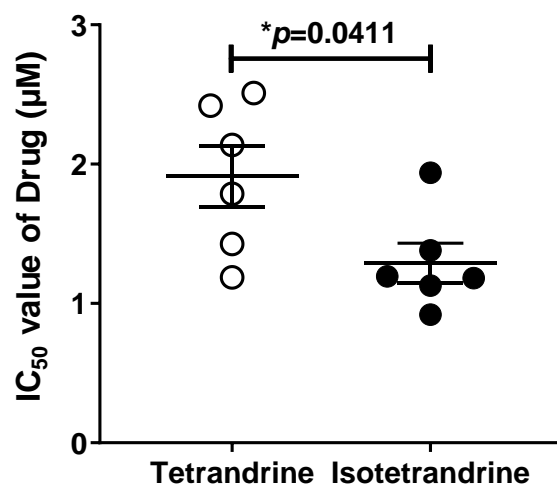


図 19 健常者 PBMC に対する Tet と Iso-Tet の増殖抑制効果 (IC_{50} 値) の比較

透析患者の PBMC の T 細胞マイトジェン応答性増殖に対する Tet と Iso-Tet の IC_{50} 値はそれぞれ $3.03 \pm 0.28 \mu M$ と $1.55 \pm 0.26 \mu M$ であり、健常者の PBMC の場合と同様に Iso-Tet の方が有意に強い抑制効果を示した ($p=0.0070$) (図 20)。

なお Tet の増殖抑制作用は、透析患者 PBMC に対する効果 (IC_{50} 値: $3.03 \pm 0.28 \mu M$) より健常者 PBMC に対する効果 (IC_{50} 値: $1.91 \pm 0.22 \mu M$) の方が有意に強かった ($p=0.035$) (データ未掲載)。

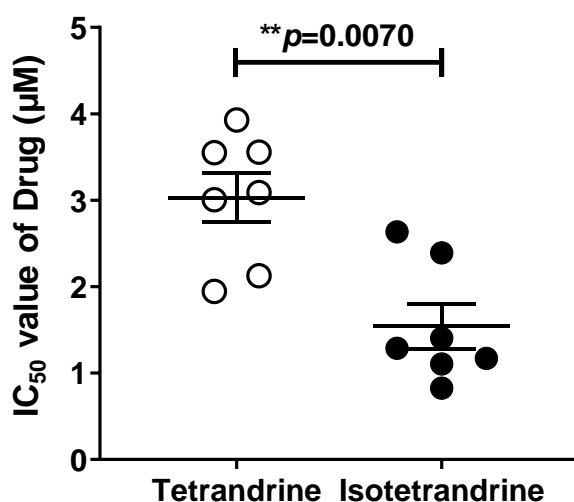


図 20 透析患者 PBMC に対する Tet と Iso-Tet の増殖抑制効果 (IC_{50} 値) の比較

2. MOLT-4 細胞と MOLT-4/DNR 細胞の NF- κ B の発現量や活性化に対する Tet および Iso-Tet の効果の比較

MOLT-4 細胞と MOLT-4/DNR 細胞の NF- κ B および活性化 NF- κ B (p-NF- κ B) の発現量に対する、Tet と Iso-Tet の効果について検討した。

Iso-Tet は、MOLT-4 細胞における NF- κ B およびリン酸化 NF- κ B (p-NF- κ B) の発現量を有意に減少させた ($p<0.05$) (図 21A)。MOLT-4/DNR 細胞に対しても同様に、Iso-Tet は NF- κ B および p-NF- κ B の発現量を有意に減少させた ($p<0.05$) (図 21B)。一方、Tet も同様の傾向を示したが、その効果は有意ではなかった。

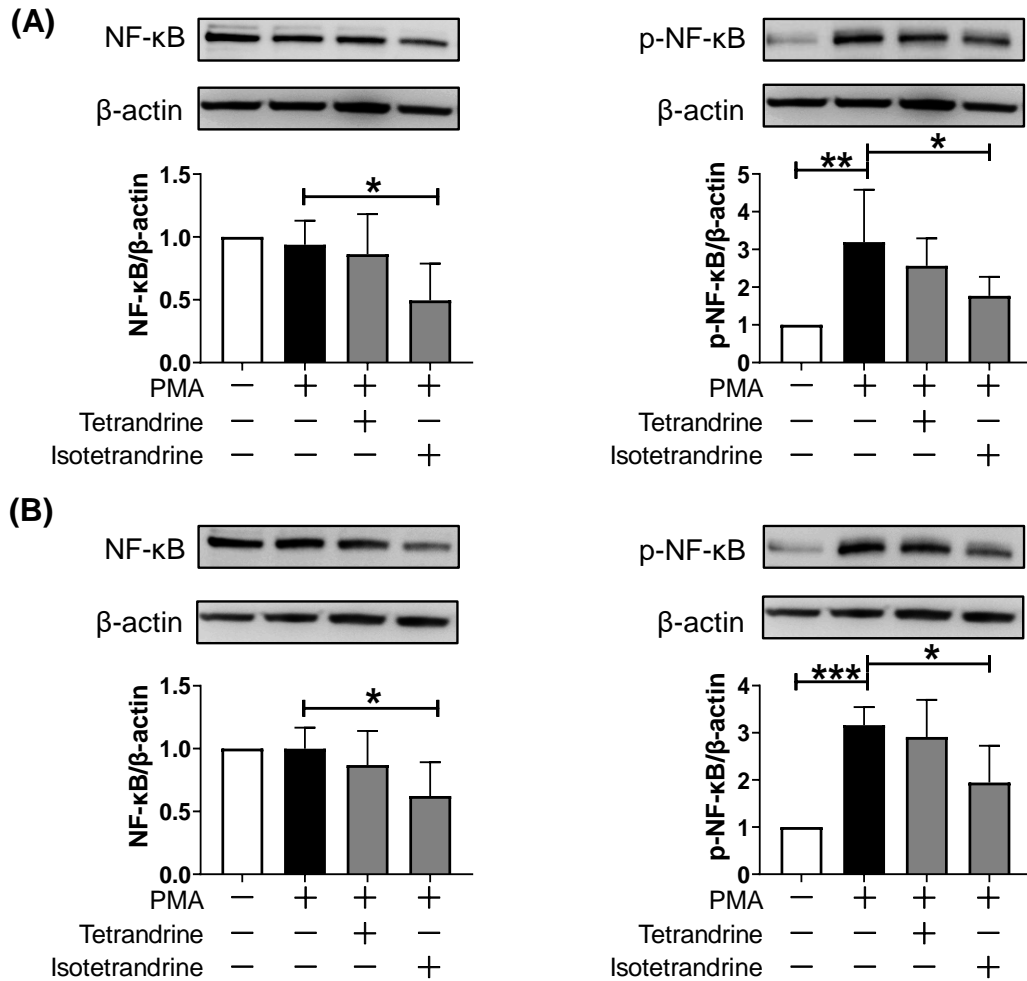


図 21 MOLT-4 細胞(A)および MOLT-4/DNR 細胞(B)における NF-κB およびリン酸化 NF-κB (p-NF-κB) の発現量に対する Tet と Iso-Tet の効果

写真はそれぞれ NF-κB(左側)と p-NF-κB(右側)発現の典型的な一例を示す。β-アクチンは対照として用いた。その下の棒グラフは、これら各転写因子発現量の平均(SD)値(n=6)を示す。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ (Bonferroni multiple comparison test による)

3. Tet およびその類縁体における NF-κB の発現量および活性化に着目した細胞増殖抑制効果の構造活性相関

MOLT-4 細胞、MOLT-4/DNR 細胞、健常者 PBMC および透析患者 PBMC の 4 系統の細胞に対する、Tet、Iso-Tet、Fangchinoline、Berbamine、Dauricine、Cepharanthine および Armeapavine の増殖抑制効果(図 22-26、表 4-7)、並びに NF-κB と活性化 NF-κB (p-NF-κB) の発現量に対する抑制効果(図 27)を比較検討

した。

Iso-Tet と Berbamine の化学構造は、C12 の置換基がメトキシ基 ($-\text{OCH}_3$) かヒドロキシ基 ($-\text{OH}$) かによって異なる (図 2)。MOLT-4 細胞、MOLT-4/DNR 細胞、健常者 PBMC、および透析患者 PBMC の増殖に対する Iso-Tet の平均 (SD) IC_{50} 値はそれぞれ 2.19 ± 0.27 、 2.28 ± 0.33 、 1.29 ± 0.14 および $1.50 \pm 0.17 \mu\text{M}$ であり、一方 Berbamine の IC_{50} 値はそれぞれ >10 、 >10 、 3.83 ± 0.38 および $6.29 \pm 0.64 \mu\text{M}$ であった。このように、検討した全ての細胞種に対して、Iso-Tet は Berbamine より強い増殖抑制効果を示した (図 22、表 4-7)。なお Berbamine は、NF- κB や p-NF- κB の発現量に影響を及ぼさなかった (図 27)。

Tet と Fangchinoline の化学構造は、C7 の置換基がそれぞれメトキシ基 ($-\text{OCH}_3$) とヒドロキシ基 ($-\text{OH}$) である点で異なる (図 2)。MOLT-4 細胞、MOLT-4/DNR 細胞、健常者 PBMC および透析患者 PBMC の増殖に対する Tet の平均 (SD) IC_{50} 値はそれぞれ 4.43 ± 0.22 、 3.62 ± 0.22 、 1.91 ± 0.22 および $2.76 \pm 0.29 \mu\text{M}$ であった。一方 Fangchinoline の IC_{50} 値はそれぞれ 5.60 ± 0.19 、 5.36 ± 0.35 、 1.83 ± 0.29 および $2.38 \pm 0.28 \mu\text{M}$ であり (図 23、表 4-7)、P 糖タンパク質高発現による薬剤耐性を獲得した MOLT-4/DNR 細胞に対しては、C7 にメトキシ基を持つ Tet の方が優れた細胞増殖抑制効果を示した (図 23、表 4,5)。しかしながら、MOLT-4/DNR 細胞における NF- κB や p-NF- κB の発現量に与える影響は、両化合物間でほぼ同等であった (図 27)。

Arnepavine (図 2) は monobenzylisoquinoline であり、MOLT-4 細胞、MOLT-4/DNR 細胞、および透析患者 PBMC に対しては $10 \mu\text{M}$ で細胞増殖抑制効果を示さず、健常者 PBMC に対してのみ細胞増殖抑制効果を示したが、Tet や Iso-Tet と比較するとその効果は弱かった (図 24、表 4-7)。一方、MOLT-4 細胞と MOLT-4/DNR 細胞の NF- κB および p-NF- κB の発現量に対する影響は僅かであった (図 27)。

Tet、Iso-Tet、Fangchinoline、Berbamine、Cepharanthine は構造内に 18 員環マクロ環状構造を形成しているが、Dauricine はマクロ環状構造を有していない (図 2)。Dauricine は、Tet や Iso-Tet と比較して、健常者 PBMC の増殖に対する効果はほぼ同等であったが、MOLT-4/DNR 細胞増殖抑制効果は著しく弱かった (図 25、表 4-7)。MOLT-4 細胞と MOLT-4/DNR 細胞の NF- κB および p-NF- κB 発現量への Dauricine の影響は、Tet と同等であった (図 27)。

Tet および Iso-Tet は、一方の benzylisoquinoline ユニットが C8、C7' 間でエーテル結合しているが、Cepharanthine は C7、C8' 間でエーテル結合している。しかしながら、その細胞増殖抑制効果や NF- κB および p-NF- κB の発現量に対する効果は、Tet および Iso-Tet と類似していた (図 26,27、表 4-7)。

表 4 Tet 類縁体の benzyloquinoline alkaloid の MOLT-4 細胞に対する増殖抑制効果 (IC₅₀ 値)

| Benzyloquinoline alkaloid | IC ₅₀ value (μM) |
|---------------------------|-----------------------------|
| Tetrandrine (Tet) | 4.43±0.22 |
| Isotetrandrine (Iso-Tet) | 2.19±0.27** |
| Fangchinoline | 5.60±0.19#### |
| Berberamine | > 10****, #### |
| Dauricine | 5.30±0.81### |
| Cepharanthine | 4.38±0.26## |
| Artemepavine | > 10****, #### |

Data were analyzed using Bonferroni multiple comparison test. ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$ as compared with Tet; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ and #### $p < 0.0001$ as compared with Iso-Tet.

表 5 Tet 類縁体の benzyloquinoline alkaloid MOLT-4/DNR 細胞に対する増殖抑制効果 (IC₅₀ 値)

| Benzyloquinoline alkaloid | IC ₅₀ value (μM) |
|---------------------------|---------------------------------|
| Tetrandrine (Tet) | 3.62±0.22 |
| Isotetrandrine (Iso-Tet) | 2.28±0.33 ^{**} |
| Fangchinoline | 5.36±0.35 ^{***, ####} |
| Berbamine | > 10 ^{****, ####} |
| Dauricine | 8.01±0.95 ^{****, ####} |
| Cepharanthine | 3.91±0.47 |
| Armepavine | > 10 ^{****, ####} |

Data were analyzed using Bonferroni multiple comparison test. ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.01$ and ^{****} $p < 0.0001$ as compared with Tet; ^{####} $p < 0.0001$ as compared with Iso-Tet.

表 6 Tet 類縁体の benzyloquinoline alkaloid の健常者 PBMC に対する増殖抑制効果 (IC₅₀ 値)

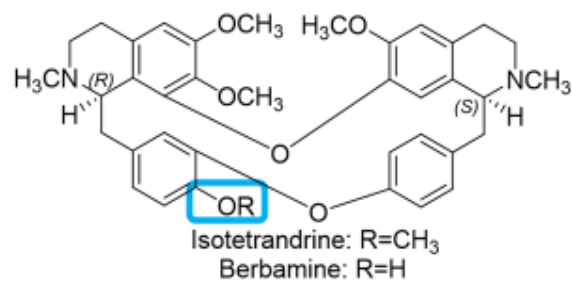
| Benzyloquinoline alkaloid | IC ₅₀ value (μM) |
|---------------------------|----------------------------------|
| Tetrandrine (Tet) | 1.91±0.22 |
| Isotetrandrine (Iso-Tet) | 1.29±0.14* |
| Fangchinoline | 1.83±0.29 |
| Berbamine | 3.83±0.38 ^{***} , ##### |
| Dauricine | 1.35±0.26 |
| Cepharanthine | 2.18±0.28 |
| Artemepavine | 7.37±1.33 ^{***} , ##### |

Data were analyzed using Bonferroni multiple comparison test. * $p < 0.05$ and ^{***} $p < 0.001$ as compared with Tet; ##### $p < 0.0001$ as compared with Iso-Tet.

表 7 Tet 類縁体の benzyloquinoline alkaloid の透析患者 PBMC に対する増殖抑制効果 (IC₅₀ 値)

| Benzyloquinoline alkaloid | IC ₅₀ value (μM) |
|---------------------------|---------------------------------|
| Tetrandrine (Tet) | 2.76±0.29 |
| Isotetrandrine (Iso-Tet) | 1.50±0.17 ^{**} |
| Fangchinoline | 2.38±0.28 ^{####} |
| Berbamine | 6.29±0.64 ^{****, ####} |
| Dauricine | 4.37±0.36 ^{**, ####} |
| Cepharanthine | 2.81±0.44 |
| Artemepavine | > 10 ^{****, ####} |

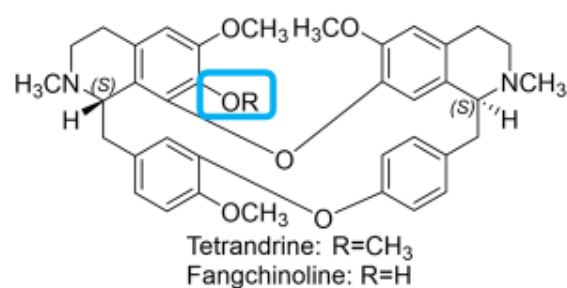
Data were analyzed using Bonferroni multiple comparison test. ^{**} $p < 0.01$ and ^{****} $p < 0.0001$ as compared with Tet; ^{####} $p < 0.0001$ as compared with Iso-Tet.



| | Tet IC ₅₀ (μM) | Iso-Tet IC ₅₀ (μM) | Berbamine IC ₅₀ (μM) |
|--------------|------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| MOLT-4細胞 | 4.43 ± 0.22 | 2.19 ± 0.27** | > 10****,# |
| MOLT-4/DNR細胞 | 3.62 ± 0.22 | 2.28 ± 0.33** | > 10***,# |
| 健常者PBMC | 1.91 ± 0.22 | 1.29 ± 0.14* | 3.83 ± 0.38****,# |
| 透析患者PBMC | 2.76 ± 0.29 | 1.50 ± 0.17** | 6.29 ± 0.64****,# |

Bonferroni multiple comparison test, compared with Tet **p*<0.05, ***p*<0.01 ****p*<0.001, *****p*<0.0001
Bonferroni multiple comparison test, compared with Iso-Tet #*p*<0.0001

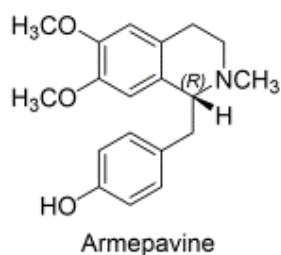
図 22 構造活性相関— i) C12 位置換基のメトキシ基とヒドロキシ基による違い



| | Tet IC ₅₀ (μM) | Iso-Tet IC ₅₀ (μM) | Fangchinoline IC ₅₀ (μM) |
|--------------|------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------|
| MOLT-4細胞 | 4.43 ± 0.22 | 2.19 ± 0.27** | 5.60 ± 0.19# |
| MOLT-4/DNR細胞 | 3.62 ± 0.22 | 2.28 ± 0.33** | 5.36 ± 0.35***,# |
| 健常者PBMC | 1.91 ± 0.22 | 1.29 ± 0.14 | 1.83 ± 0.29 |
| 透析患者PBMC | 2.76 ± 0.29 | 1.50 ± 0.17 | 2.38 ± 0.28# |

Bonferroni multiple comparison test, compared with Tet **p*<0.05, ***p*<0.01 ****p*<0.001, *****p*<0.0001
Bonferroni multiple comparison test, compared with Iso-Tet #*p*<0.0001

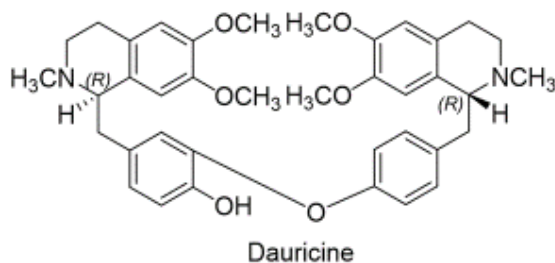
図 23 構造活性相関— ii) C7 位置換基のメトキシ基とヒドロキシ基による違い



| | Tet IC ₅₀ (μM) | Iso-Tet IC ₅₀ (μM) | Armepavine IC ₅₀ (μM) |
|--------------|------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| MOLT-4細胞 | 4.43 ± 0.22 | 2.19 ± 0.27** | > 10****, # |
| MOLT-4/DNR細胞 | 3.62 ± 0.22 | 2.28 ± 0.33** | > 10****, # |
| 健常者PBMC | 1.91 ± 0.22 | 1.29 ± 0.14 | 7.37 ± 1.33***, # |
| 透析患者PBMC | 2.76 ± 0.29 | 1.50 ± 0.17 | > 10****, # |

Bonferroni multiple comparison test, compared with Tet * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$
 Bonferroni multiple comparison test, compared with Iso-Tet # $p < 0.0001$

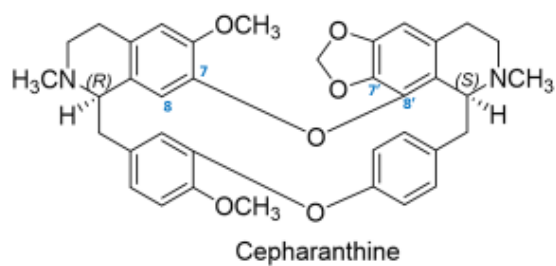
図 24 構造活性相関— iii) monobenzylisoquinoline と bisbenzylisoquinoline 構造による違い



| | Tet IC ₅₀ (μM) | Iso-Tet IC ₅₀ (μM) | Dauricine IC ₅₀ (μM) |
|--------------|------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| MOLT-4細胞 | 4.43 ± 0.22 | 2.19 ± 0.27** | 5.30 ± 0.81# |
| MOLT-4/DNR細胞 | 3.62 ± 0.22 | 2.28 ± 0.33** | 8.01 ± 0.95****, ## |
| 健常者PBMC | 1.91 ± 0.22 | 1.29 ± 0.14 | 1.35 ± 0.26 |
| 透析患者PBMC | 2.76 ± 0.29 | 1.50 ± 0.17 | 4.37 ± 0.36**, ## |

Bonferroni multiple comparison test, compared with Tet * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$
 Bonferroni multiple comparison test, compared with Iso-Tet # $p < 0.001$, ## $p < 0.0001$

図 25 構造活性相関— iv) 18 員環マクロ環状構造の有無による違い



| | Tet IC ₅₀ (μM) | Iso-Tet IC ₅₀ (μM) | Cepharanthine IC ₅₀ (μM) |
|--------------|------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------|
| MOLT-4細胞 | 4.43 ± 0.22 | 2.19 ± 0.27 ^{**} | 4.38 ± 0.26 [#] |
| MOLT-4/DNR細胞 | 3.62 ± 0.22 | 2.28 ± 0.33 ^{**} | 3.91 ± 0.47 |
| 健常者PBMC | 1.91 ± 0.22 | 1.29 ± 0.14 | 2.18 ± 0.28 |
| 透析患者PBMC | 2.76 ± 0.29 | 1.50 ± 0.17 | 2.81 ± 0.44 |

Bonferroni multiple comparison test, compared with Tet * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$
 Bonferroni multiple comparison test, compared with Iso-Tet # $p < 0.01$

図 26 構造活性相関— v) マクロ環を形成するエーテル酸素原子の結合位置による違い

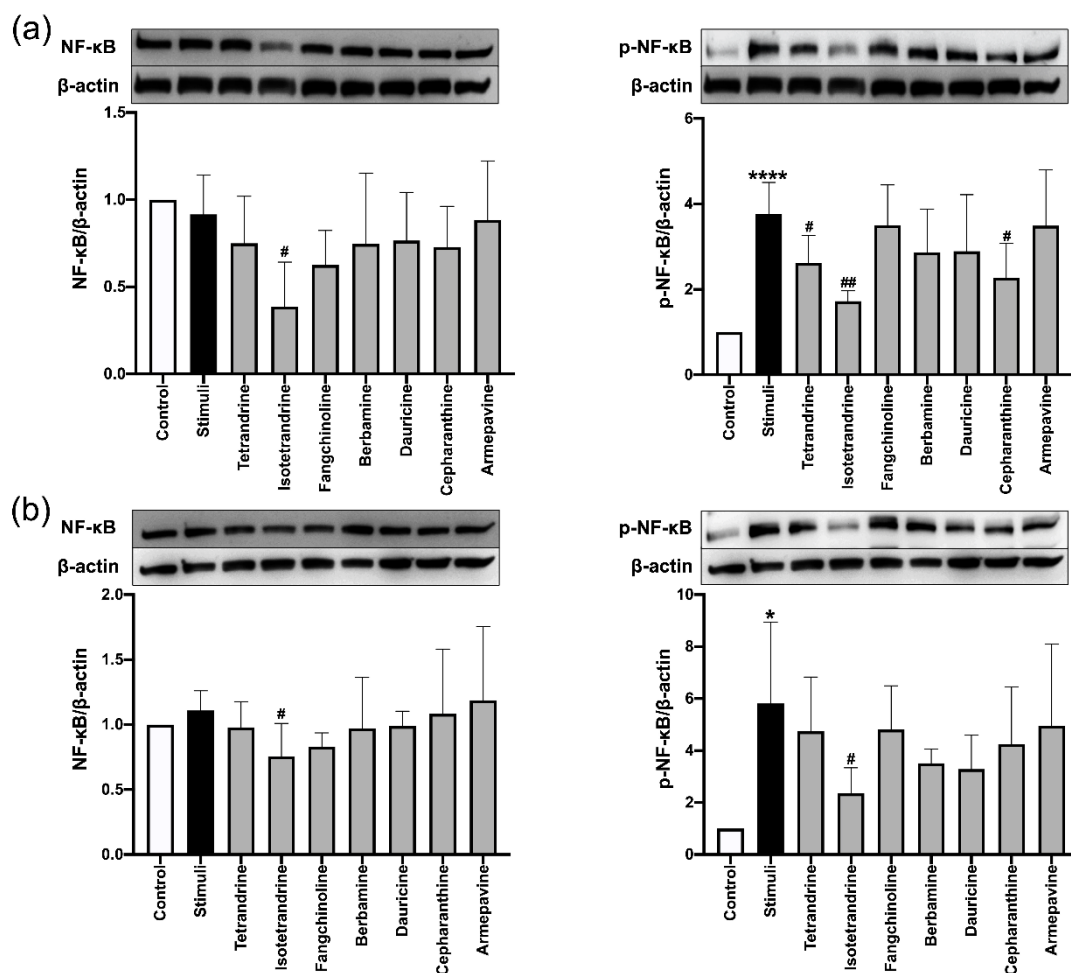


図 27 MOLT-4 細胞 (a) および MOLT-4/DNR 細胞 (b) の NF-κB およびリン酸化 NF-κB (p-NF-κB) 発現に対する Tet、Iso-Tet、Fangchinoline、Berbamine、Dauricine、Cepharanthine および Armepavine の効果

写真は、NF-κB (左側) と p-NF-κB (右側) 発現の典型的な一例を示す。β-アクチンは対照として用いた。その下の棒グラフは、これら各転写因子発現量の平均 (SD) 値 (n=4) を示す。

* $p < 0.05$, and **** $p < 0.0001$ as compared with the group of control. # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ as compared with the group of stimuli (Bonferroni multiple comparison test による)。

第四節 考察

Iso-Tet は、ヒト T リンパ芽球性白血病細胞株の MOLT-4 細胞およびその DNR 耐性株細胞である MOLT-4/DNR 細胞の *in vitro* 増殖を有意に抑制した。MOLT-4/DNR 細胞は、MOLT-4 細胞を DNR 存在下に長期培養することによって、薬物耐性の原因となる P 糖タンパク質を高発現させた細胞である³⁶⁾。P 糖タンパク質を高発現した薬物耐性 T 細胞は臨床でも起こり得るため、本章では親株の MOLT-4 細胞と合わせて本耐性細胞株に対する効果も検討した。T 細胞の性質を有し薬物耐性を示す MOLT-4/DNR 細胞に対して Tet と Iso-Tet が増殖抑制効果を示したことは、これらの化合物の作用が P 糖タンパク高発現に基づく薬物耐性の影響を受けないことを示唆する。また、Tet と Iso-Tet が P 糖タンパク質の高発現による薬物耐性機序を阻害して、抗がん剤である DNR や Doxorubicin の効果を増強させるとの報告もある^{37,38)}。

本章の結果から、ヒト T リンパ芽球性白血病細胞の増殖に対する Iso-Tet の抑制効果の分子機序は、NF- κ B およびその活性化体であるリン酸化 NF- κ B (p-NF- κ B) の発現量を抑制することに基づくと思われる。

免疫抑制薬の治療効果は患者間で大きく異なることが知られており、そのため本章ではさらに健常者および透析患者の PBMC を用いて、Tet と Iso-Tet の細胞増殖抑制効果を評価した。その結果どちらの被験者由来 PBMC に対しても、Iso-Tet は Tet と比較して強い増殖抑制効果を示した。なお透析患者 PBMC に対する Tet の抑制効果は、健常者 PBMC に対する効果と比較して弱かった。先の研究においても、透析患者は免疫抑制薬に対する反応性が低いことが報告されている⁹⁾。

本章ではさらに、新規免疫抑制薬の開発に用いるリード化合物の探索のために Tet を含む 7 種の類縁体に対して同様の実験を行い、構造活性相関を検証した。Tet、Iso-Tet、Fangchinoline、Berbamine、Dauricine および Cepharanthine は 2 分子の benzyloquinoline ユニットがエーテル結合した bisbenzyloquinoline アルカロイドである(図 28)。それらのうち、Tet、Iso-Tet、Fangchinoline、Berbamine、Cepharanthine は 2 つの benzyloquinoline ユニットどうしが、さらに分子内でエーテル結合した 18 員環マクロ環状構造を有している。Tet、Iso-Tet、Fangchinoline、Berbamine では C8、C7' 間および C11、C12' 間でエーテル結合を形成しているが Cepharanthine は 2 つの benzyloquinoline ユニットが C7、C8' 間および C11、C12' 間でエーテル結合している。Armeapavine は monobenzyloquinoline アルカロイドである。

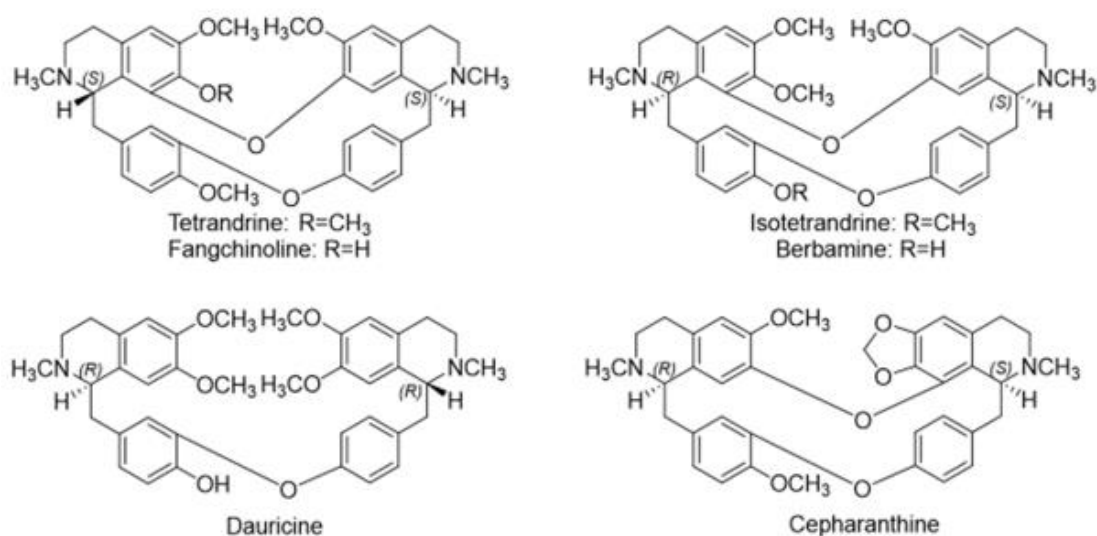


図 28 bisbenzylisoquinoline アルカロイドの構造式

C12 の置換基が異なる **Iso-Tet** と **Berbamine** の作用を比較することにより、C12 の置換基の違いは T 細胞増殖抑制効果に強く寄与していることがわかった。Li らは、**Tet** が **Berbamine** よりも抗炎症作用や免疫抑制作用において優っていると報告している³⁹⁾。

また、C7 の置換基が異なる **Tet** と **Fangchinoline** の比較により、C7 の置換基も T 細胞増殖抑制効果に影響を与えるが、C12 の置換基ほどの強い寄与はないことが分かった。特に **MOLT-4/DNR** 細胞に対しては **Fangchinoline** の抑制効果は弱く、薬物耐性の原因となる P 糖タンパク質を高発現する細胞に対しては、C7 置換基の違いは増殖抑制効果に大きく関与すると考えられた。しかしながら、**NF-κB** および活性化 **NF-κB (p-NF-κB)** 発現量に対する両化合物の効果は同等であったことから、これらの化合物による T 細胞増殖抑制効果には **NF-κB** 以外の機序も関与していることが示唆された。

monobenzylisoquinoline 骨格を持つ **Armepavine** の T 細胞増殖抑制効果は弱いため、リード化合物として **bisbenzylisoquinoline** 構造が適していると考えられた。

マクロ環骨格に 2 つの酸素原子を含む 18 員環構造を有する化合物は、環状構造を持たない **Dauricine** と比べて増殖抑制効果が優れていた。**MOLT-4/DNR** 細胞に対する **Dauricine** の増殖抑制効果が著しく低かったことから、18 員環マクロ環状構造の存在が P 糖タンパク質による薬物耐性を回避する過程に大きく関与していると考えられた。

Cepharanthine が **Tet** および **Iso-Tet** と同等に T 細胞の増殖や活性化 **NF-κB** と **p-NF-κB** の発現量を抑制したことから、2 つの **benzylisoquinoline** ユニットを繋

グエーテル酸素原子の芳香環上の結合位置の違いは T 細胞増殖抑制効果に大きく影響しないものと考えられた。安田らは、健康成人男子にセファランチン®(タマサキツヅラフジ抽出アルカロイド) 100 mg を単回静脈内投与したときのセファランチン®の血中濃度 C_{max} は、1464±364 ng/mL (mean±SE) を示したと報告している⁴⁰⁾。この濃度は Cepharanthine 2.41 μM に相当し、本研究における PBMC に対する Cepharanthine の IC₅₀ 値(表 6,7)と近似しており、臨床でも到達可能な濃度と思われた。

最後に、本章ではヒト T 細胞性白血病 MOLT-4 細胞とその薬物耐性株の MOLT-4/DNR 細胞に対する各種アルカロイドの効果を比較検討したが、いずれの化合物とも親株と耐性株に対する効果に大きな差がなかったため、その増殖抑制作用機序に P 糖タンパク質は大きく関与していないことが示唆された。

第五節 小括

Tet の立体異性体である Iso-Tet は、MOLT-4 細胞や MOLT-4/DNR 細胞の増殖、および健常者と透析患者の PBMC の T 細胞マイトジェン応答性増殖に対し、Tet と比較していずれも有意に強い抑制効果を示した。Tet の細胞増殖抑制効果の分子機序は、NF-κB およびその活性化体であるリン酸化 NF-κB (p-NF-κB) の発現抑制に一部基づくことが示唆された。Tet 類縁体を用いた構造活性相関解析より、C12 位の置換基と C7 位の置換基が T 細胞増殖抑制効果に寄与しており、特に C12 置換基の影響が大きいと思われた。また、bisbenzylisoquinoline 構造を持つ化合物の方が monobenzylisoquinoline 構造を有する化合物より T 細胞増殖抑制効果が優れていることが分かった。18 員環マクロ環状構造の存在は強く T 細胞増殖抑制効果に影響を与えるが、2 つの benzylisoquinoline ユニットを繋ぐグエーテル酸素原子の芳香環上の結合位置の違いは、活性に大きく影響しないものと思われた。

本章で述べた知見から、Iso-Tet は新たな免疫抑制薬として開発する価値を持つ化合物と考えられた。また、構造活性相関の検証結果をもとに、より有望なアナログを合成し新規免疫抑制薬に近づくことができるものと思われた。

総 括

CKD 患者において、尿毒症症状が顕著となり腎の保存的治療では管理不可能と判断された場合に、腎代替療法が導入される。腎代替療法には血液、腹膜透析療法と腎移植療法の選択肢がある。

血液透析患者においては、医療施設にて透析を行うため継続的に定期的な通院を要し、QOL が影響を受ける。また、透析患者の死因の第 2 位は感染症であり、同患者における感染症コントロールの必要性は高い。

腎移植療法では、拒絶反応を予防する目的で免疫抑制薬物療法が必要不可欠となる。しかしながら、既存の免疫抑制薬物療法ではその副作用や日和見感染が臨床上大きな問題となる。

これらの背景より、申請者は本研究にて、既存の腎代替療法における患者予後に影響を与えるリスク軽減を目的とした感染症モニタリングの新規手法と、腎移植後の免疫抑制療法を改善し得る新規免疫抑制薬に関する検討を行った。

1) 健常者、透析患者および慢性腎不全患者の末梢血 T リンパ球中の ATP 量に関する検討

患者末梢血 T リンパ球中の ATP 定量により、慢性腎臓病患者では健常者に比べて CKD の早期 Stage から易感染状態となっていることを明らかにした。ATP 値をバイオマーカーとして、個々の患者において感染コントロールを早期より実施すれば、感染症による予後への影響を改善できる可能性が示された。

しかし、末期腎不全にあたる透析患者および G5 群の患者においては、早期 Stage の CKD 患者と異なり患者間で ATP 値にばらつきがあり、健常者との間に有意差を認めなかった。尿毒症の病態やその原因物質あるいは透析治療によって末梢 T リンパ球が何らかの影響を受けていることが、ATP 値の個人差を生んでいるものと考えられ、患者個々への対応が必要と思われた。

以上本章の結果から、末梢血 T リンパ球中の ATP 定量は、透析患者および CKD 患者の感染症を未然にコントロールするためのテーラーメイド医療の一助となることが示唆され、腎移植後の免疫抑制薬物療法による日和見感染症の軽減にも寄与できると考えられた。

2) 健常者および透析患者の末梢血単核細胞の T 細胞マイトジェン応答性増殖に対するビタミン K1 および K2 の抑制効果

腎疾患患者や腎移植患者等の治療に用いられている既存薬の中から、免疫抑制効果を有しあるいは既存の免疫抑制薬の効果を増強する可能性のある VK 類に着目し、本章の研究を実施した。

健常者および透析患者の PBMC の T 細胞マイトジェン応答性増殖に対し、VK1 は抑制効果を示さなかったが、VK2 は有意な増殖抑制効果を示した。作用メカニズム解析のために、まず健常者および透析患者の PBMC から分泌される Th1/Th2/Th17 由来サイトカイン量を検討したところ、VK2 は健常者 PBMC からの IL-4 産生量を増加させたが、その他のサイトカインの産生量には影響を及ぼさなかった。一方 VK2 は、末梢リンパ球中の Treg 率を用量依存的に減少させた。この傾向は透析患者の末梢リンパ球においてより強く現れ、VK2 の T リンパ球抑制効果のメカニズムに Treg への作用が関連していることが示唆された。

以上の VK2 の作用は、通常投与量の VK2 で得られる血中濃度を大きく上回る濃度によってのみ現れるため、例えば VK2 を副腎皮質ステロイド薬と併用することにより臨床応用が可能になるものと思われた。VK2 と副腎皮質ステロイド薬の相乗効果によってステロイド薬の減量が期待でき、さらにはステロイド薬が誘発する日和見感染症や骨粗鬆症のリスクを低減できる可能性が示された。

3) 植物由来アルカロイドの **Tetrandrine** およびその類縁体の T リンパ球抑制効果に関する検討

Iso-Tet は Tet に比べて、MOLT-4 と MOLT-4/DNR 細胞、および健常者と透析患者の PBMC に対して、より強い増殖抑制効果を示した。また、Tet と Iso-Tet は共に、MOLT-4 および MOLT-4/DNR 細胞の NF- κ B と p-NF- κ B 発現を抑制したが、この効果も Iso-Tet の方が強かった。Iso-Tet と Tet の化学構造における絶対配置の違いが、T 細胞増殖抑制効果に違いを与えているものと考えられた。これらの結果より、Iso-Tet は新規免疫抑制薬としてより有望な化合物であることが示唆された。

7 種の Tet 類縁体を用いた構造活性相関解析の結果、C12 および C7 位の置換基は T 細胞増殖抑制効果に寄与し、特に C12 位の寄与が大きいことが示された。また、monobenzylisoquinoline 構造を有する化合物より bisbenzylisoquinoline 構造を持つ化合物の方がリード化合物として優れていた。一方、18 員環マクロ環状構造の存在は T 細胞増殖抑制効果に寄与し、P 糖タンパク質高発現による薬物耐性を回避する過程にも関与している。2 分子の benzylisoquinoline ユニットの一方のエーテル酸素原子の芳香環上の結合位置の違いは、T 細胞増殖抑制効果にさほど寄与しない。

以上得られた構造活性相関の知見を活かしてアナログを合成することにより、より有望な新規免疫抑制薬候補化合物を提案できるものと思われた。

本章で述べた知見から、Iso-Tet は新たな免疫抑制薬として開発する価値を持つ化合物と考えられた。また、構造活性相関の検証結果をもとに、より有望なアナログを合成し新規免疫抑制薬に近づくことができるものと思われた。

以上の知見より、透析患者および **CKD** 患者の末梢 **T** リンパ球中の **ATP** 値がこれらの患者における易感染性のバイオマーカーとなり得ること、および本情報に基づいてテーラーメイド療法を実施すれば同患者における感染症での死亡率を低減できる可能性を示した。さらに、**VK2** および **Tet** の類縁体は腎移植時に用いられる既存の免疫抑制薬の代替えもしくは併用薬として有望であり、今後更なる検討を重ねることにより臨床への応用が期待できるものと結論した。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました東京薬科大学薬学部臨床薬理学教室 平野 俊彦教授に心から深い感謝の意を表します。

臨床薬理の研究の心得を論しながら、導いてくださいました杉山 健太郎准教授に感謝いたします。また、当研究に協力頂いた臨床薬理学教室の恩田 健二講師、田中 祥子助教をはじめとする同教室の留学生、大学院生および卒論生の方々に厚く御礼申し上げます。

私の学士および修士の際に温かくご指導頂き、卒業後にも関わらず平野 俊彦教授をご紹介頂きました天然医薬品化学教室 竹谷 孝一名誉教授に感謝いたします。

私の研究に理解を頂き、患者同意の取得や血液サンプルの取得を協力頂きました一般財団法人神奈川県警友会けいゆう病院の藤井 芳明院長、松田 洋人腎臓内科部長に感謝申し上げます。

さらに、私の研究意思を理解しけいゆう病院薬剤部に受け入れてくださいました関山 正夫元薬局長に深く御礼申し上げます。最後に、私の研究活動を温かく見守っていただきました安藤 栄輝前薬局長、林 誠一薬剤部長をはじめとするけいゆう病院の薬剤師の皆様、採血にご協力頂きました臨床工学士、看護師の皆様に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 日本透析医学会統計資料 わが国の慢性透析療法の現況（2018 年透析導入患者の動態）
- 2) Husain S, Raza K, Pilewski JM, Zaldonis D, Crespo M, Toyoda Y, Shutt K, Spichty K, Bentlejewski C, Pakstis DL, Carey ME, McCurry KR, Zeevi A. Experience with immune monitoring in lung transplant recipients: correlation of low immune function with infection. *Transplantation*. 2009;87:1852-1857.
- 3) Sánchez-Velasco P, Rodrigo E, Valero R, Ruiz JC, Fernández-Fresnedo G, López-Hoyos M, Piñera C, Palomar R, Leyva-Cobián F, Arias M. Intracellular ATP concentrations of CD4 cells in kidney transplant patients with and without infection. *Clin Transplant*. 2008;22:55-60.
- 4) Kobashigawa JA, Kiyosaki KK, Patel JK Kittleson MM, Kubak BM, Davis SN, Kawano MA, Ardehali AA. Benefit of immune monitoring in heart transplant patients using ATP production in activated lymphocytes. *J Heart Lung Transplant*. 2010;29:504-508.
- 5) Sugiyama K, Tsukaguchi M, Toyama A, Satoh H, Saito K, Nakagawa Y, Takahashi K, Tanaka S, Onda K, Hirano T. Immune monitoring with a lymphocyte adenosine triphosphate assay in kidney transplant recipients treated with a calcineurin inhibitor. *Exp Clin Transplant*. 2014;12:195-199.
- 6) Israeli M, Klein T, Sredni B, Avitzur Y, Mor E, Bar-Nathen N, Steinberg R, Dinari G, Shapiro R. ImmuKnow: a new parameter in immune monitoring of pediatric liver transplantation recipients. *Liver Transpl*. 2008;14(6):893-898.
- 7) Hirano T, Oka K, Takeuchi H, Sakurai E, Matsuno N, Tamaki T, Kozaki M. Clinical significance of glucocorticoid pharmacodynamics assessed by antilymphocyte action in kidney transplantation. Marked difference between prednisolone and methylprednisolone. *Transplantation*. 1994;57:1341-1348.
- 8) Sugiyama K, Satoh H, Saito K, Takahashi K, Saito N, Hirano T. Immunosuppressive efficacy of mycophenolate mofetil when compared with azathioprine and mizoribine against peripheral lymphocytes from renal transplant recipients. *Transpl Int*. 2005;18:590-595.
- 9) Sugiyama K, Isogai K, Toyama A, Satoh H, Saito K, Nakagawa Y, Tasaki M, Takahashi K, Saito N, Hirano T. Cyclosporine pharmacological efficacy estimated by lymphocyte immunosuppressant sensitivity test before and after renal transplantation. *J Clin Pharm Ther*. 2009;34: 539-545.
- 10) Sugiyama K, Isogai K, Horisawa S, Toyama A, Satoh H, Saito K, Nakagawa

- Y, Tasaki M, Takahashi K, Hirano T. The pharmacological efficacy of mycophenolic acid before and after renal transplantation as estimated by the lymphocyte immunosuppressant sensitivity test (LIST). *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2010;32:430-436.
- 11) Sugiyama K, Isogai K, Horisawa S, Toyama A, Satoh H, Saito K, Nakagawa Y, Tasaki M, Takahashi K, Hirano T. Comparative study of the cellular pharmacodynamics of tacrolimus in renal transplant recipients treated with and without basiliximab. *Cell Transplant*. 2012;21:565-570.
 - 12) Sugiyama K, Isogai K, Toyama A, Satoh H, Saito K, Nakagawa Y, Tasaki M, Takahashi K, Hirano T. Clinical significance of the pharmacological efficacy of tacrolimus estimated by the lymphocyte immunosuppressant sensitivity test (LIST) before and after renal transplantation. *Cell Med*. 2012;3(1-3):81-88.
 - 13) Hatanaka H, Ishizawa H, Nakamura Y, Hiroshige, Tadokoro H, Tanaka H, Onda K, Sugiyama K, Hirano T. Effects of vitamin K3 and K5 on proliferation, cytokine production, and regulatory T cell-frequency in human peripheral-blood mononuclear cells. *Life Sci*. 2014 Mar 18;99(1-2):61-8.
 - 14) Suzuki Y, Nawata H, Soen S, Fujiwara S, Nakayama H, Tanaka I, Ozono K, Sagawa A, Takayanagi R, Tanaka H, Miki T, Masunari N, Tanaka Y. Guidelines on the management and treatment of glucocorticoid- induced osteoporosis of the Japanese Society for Bone and Mineral Research : 2014 update. *J Bone Miner Metab*. 2014;32:337-350.
 - 15) Ho LJ, Chang DM, Lee TC, Chang ML, Lai JH.. Plant alkaloid tetrandrine downregulates protein kinase C-dependent signaling pathway in T cells. *Eur J Pharmacol*. 1999 19;367(2-3):389-98.
 - 16) Liu T, Liu X, Li W. Tetrandrine, a Chinese plant-derived alkaloid, is a potential candidate for cancer chemotherapy. *Oncotarget*. 2016; 7: 40800-40815.
 - 17) Bhagya N, Chandrashekar KR. Tetrandrine-A molecule of wide bioactivity. *Phytochemistry*. 2016;125:5-13.
 - 18) Bhagya N, Chandrashekar KR. Tetrandrine and cancer-An overview on the molecular approach. *Biomed Pharmacother*. 2018;97:624-632
 - 19) Xu W, Meng K, Kusano J, Matsuda H, Hara Y, Fujii Y, Suzuki S, Ando E, Wang X, Tu Y, Tanaka S, Sugiyama K, Yamada H, Hirano T. Immunosuppressive efficacy of tetrandrine combined with methylprednisolone against mitogen-activated peripheral blood mononuclear cells of haemodialysis patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2017;44(9):924-931.

- 20)CKD ステージ G3b～5 患者のための腎障害進展予防とスムーズな腎代替療法への移行に向けた診療ガイドライン 2015,平成 26 年度厚生労働科学研究委託事業(難治性疾患等実用化研究事業(腎疾患実用化研究事業))慢性腎不全診療最適化による新規透析導入減少実現のための診療システム構築に関する研究班
- 21)Kohei N, Sawada Y, Hirai T, Omoto K, Ishida H, Tanabe K. Influence of dialysis duration on the outcome of living kidney transplantation. *Ther Apher Dial.*2014;18:481-8.
- 22)Muller LM, Gorter KJ, Hak E, Goudzwaard WL, Schellevis FG, Hoepelman AI, Rutten GE. Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clin Infect Dis.* 2005;41:281-288.
- 23)Shah BR, Hux JE. Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes. *Diabetes Care.* 2003;26:510-513.
- 24)Redaelli B. Hydroelectrolytic equilibrium change in dialysis. *J Nephrol.* 2001;14:S7-11.
- 25)Dounousi E1, Papavasiliou E, Makedou A, Ioannou K, Katopodis KP, Tselepis A, Siamopoulos KC, Tsakiris D. Oxidative stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD. *Am J Kidney Dis.* 2006;48(5):752-60.
- 26)Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, Heimbürger O, Cederholm T, Girndt M. IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia-the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int.* 2005;67:1216-1233.
- 27)Chung BH, Kim KW, Sun IO, Choi SR, Park HS, Jeon EJ, Kim BM, Choi BS, Park CW, Kim YS, Cho ML, Yang CW. Increased interleukin-17 producing effector memory T cells in the end-stage renal disease patients. *Immunol Lett.* 2012;141(2):181-189.
- 28)Sugiyama K, Isogai K, Toyama A, Satoh H, Saito K, Nakagawa Y, Tasaki M, Takahashi K, Saito N, Hirano T. Pharmacodynamic parameters of immunosuppressive drugs are not correlated with age, duration of dialysis, percentage of lymphocytes or lymphocyte stimulation index in renal transplant recipients. *Biol Pharm Bull.* 2008;31(11):2146-2149.
- 29)Saag KG, Emkey R, Schnitzer TJ, Brown JP, Hawkins F, Goemaere S, Thamsborg G, Liberman UA, Delmas PD, Malice MP, Czachur M, Daifotis AG. Alendronate for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. Glucocorticoid- Induced Osteoporosis Intervention Study Group. *N Engl J Med* 1998;339:292-299.

- 30) Adachi JD, Saag KG, Delmas PD, Liberman UA, Emkey RD, Seeman E, Lane NE, Kaufman JM, Poubelle PE, Hawkins F, Correa-Rotter R, Menkes CJ, Rodriguez-Portales JA, Schnitzer TJ, Block JA, Wing J, McIlwain HH, Westhovens R, Brown J, Melo-Gomes JA, Gruber BL, Yanover MJ, Leite MO, Siminoski KG, Nevitt MC, Sharp JT, Malice MP, Dumortier T, Czachur M, Carofano W, Daifotis A. Two-year effects of alendronate on bone mineral density and vertebral fracture in patients receiving glucocorticoids: a randomized, double-blind, placebo-controlled extension trial. *Arthritis Rheum.* 2001;44:202-211
- 31) Eastell R, Devogelaer JP, Peel NF, Chines AA, Bax DE, Sacco-Gibson N, Deuxchaisnes CN, Russell RG. Prevention of bone loss with risedronate in glucocorticoid-treated rheumatoid arthritis patients. *Osteoporos Int.* 2000;11:331-337.
- 32) Shikano K, Kaneko K, Kawazoe M, Kaburaki M, Hasunuma T, Kawai S. Efficacy of vitamin K2 for glucocorticoid-induced osteoporosis in patients with systemic autoimmune diseases. *Intern Med.* 2016;55:1997-2003.
- 33) Ebina K, Shi K, Hirao M, Kaneshiro S, Morimoto T, Koizumi K, Yoshikawa H, Hashimoto J. Vitamin K2 administration is associated with decreased disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2013;23:1001-1007.
- 34) Lang CL, Wang MH, Hung KY, Hsu SH, Chiang CK, Lu KC. Correlation of interleukin-17- producing effector memory T cells and CD4 + CD25 + Foxp3 regulatory T cells with the phosphate levels in chronic hemodialysis patients. *Sci World J.* 2014;2014(593170):9.
- 35) Xu W, Meng K, Tud Y, Tanaka S, Onda K, Sugiyama K, Hirano T, Yamada H. Tetrandrine potentiates the glucocorticoid pharmacodynamics via inhibiting P-glycoprotein and mitogen-activated protein kinase in mitogen-activated human peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Pharmacol.* 2017 Jul 15;807:102-108.
- 36) Liu ZL, Onda K, Tanaka S, Toma T, Hirano T, Oka K. Induction of multidrug resistance in MOLT-4 cells by anticancer agents is closely related to increased expression of functional P-glycoprotein and MDR1 mRNA. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2002;49:391-397.
- 37) Liu ZL, Hirano T, Tanaka S, Onda K, Oka K. reversal of P-glycoprotein-mediated daunorubicin resistance by tetrandrine in multidrug-resistant human T lymphoblastoid leukemia MOLT-4 cells. *J Pharm Pharmacol.* 2003;55:1531-

1537.

- 38) Wang TX, Yang XH. Reversal effect of isotetrandrine, an isoquinoline alkaloid extracted from *Caulis Mahoniae*, on P-glycoprotein-mediated doxorubicin-resistance in human breast cancer (MCF-7/DOX) cells. *Yao Xue Xue Bao*. 2008;43:461-466.
- 39) Li S, Ling L, Teh B, Seow W, Thong Y. Anti-inflammatory and immunosuppressive properties of the bis-benzylisoquinolines: in vitro comparisons of tetrandrine and berbamine. *Int J Immunopharmacol* 1989;11:395-401.
- 40) 安田耕太郎, 茂呂光男, 赤須通範, 大西明弘: 臨床薬理, 1989; 20(4), 741-749.